

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

THESE PRESENTEE A
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
JOHANNE BARIBEAU

LES INTERACTIONS LIPIDES-PROTEINES
DANS LA MEMBRANE POURPRE:
UNE APPROCHE ANALYTIQUE.

JANVIER 1987

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RESUME

Contenue dans sa membrane native, la bactériorhodopsine (bR) montre un maximum d'absorption à 560nm. La solubilisation de la membrane pourpre dans le lauryl sucrose provoque un léger déplacement (10nm) hypsochrome vers 550nm. Lorsque la bR est délipidée dans le lauryl sucrose, la position du maximum d'absorption de la préparation dépend alors d'un équilibre acido-basique entre deux formes spectrales du pigment (540 et 480nm) selon l'équilibre suivant: $\text{bR540} \xrightleftharpoons[\text{H}^+]{\text{OH}^-} \text{bR480}$ et le pKa de la réaction est de 6,8. Après dialyse du détergent, le même équilibre a un pKa apparent de 2,5. L'ajout de chaînes hydrocarbonnées saturées de plus en plus longues (C₈ à C₁₈) à la bR purifiée déplace le pKa de l'équilibre de telle sorte que sa valeur augmente avec la longueur de la chaîne hydrophobe (de 3,5 à 7,5 pour les C₈ à C₁₈ sucroses). Lorsque nous ajoutons du Triton X-100 à la bR délipidée, la position du maximum d'absorption revient près de sa valeur originale, soit 540nm. Le pKa de l'équilibre entre les formes spectrales est déplacé à 11, une valeur comparable à celle qui est observée dans les membranes pourpres solubilisées. Ces résultats indiquent que des interactions entre les lipides membranaires ou certains détergents et la bactériorhodopsine sont responsables du maintien de la forme spectrale pourpre (540-560nm) du pigment.

D'autre part, les spectres Raman de résonance de ces pigments (540 et 480nm) montrent qu'ils possèdent tous deux une base de Schiff protonée. De plus, nous présentons plusieurs évidences que le déplacement spectral observé lors de la délipidation est une conséquence d'une diminution des interactions du chromophore avec la bactériorhodopsine causée par un

changement structural de la protéine lorsqu'elle n'est plus en présence de ses lipides membranaires. Nous proposons donc que les interactions lipides-protéines dans la MP native sont responsables de la modulation des interactions spécifiques entre le rétinal et la protéine et que, conséquemment, l'intégrité structurale et fonctionnelle de la bR est maintenue et protégée par des interactions lipidiques.

REMERCIEMENTS

Aux membres du centre de recherche qui ont su apporter des critiques pertinentes à l'avancement de ce projet de recherche, sincères remerciements.

La réalisation de ce travail a nécessité la collaboration du Dr Chandramohan Pande (City College of the City University, New York). Il s'est montré très accueillant et nous a fait bénéficier de son expertise dans l'analyse par spectroscopie de résonnance Raman.

Je remercie également le Dr. Morris Kates et Mme Paulette Fejer (Département de Biochimie, Université d'Ottawa) pour l'enseignement et les conseils concernant la technique de préparation de la membrane pourpre.

Mes parents et mes soeurs ainsi que la famille de mon ami, Daniel Rompré, m'ont continuellement encouragé et aidé chacun à leur façon pour amener ce travail à terme. Je leur suis très reconnaissante.

Je voudrais exprimer ma gratitude la plus vive au docteur François Boucher qui m'a donné l'encouragement et la motivation nécessaire à la poursuite de cette recherche. En tant que directeur de cette recherche, il s'est montré patient et il m'a appris à réfléchir à des problèmes scientifiques. Son enseignement sera toujours des plus appréciés.

Enfin, je remercie le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada et le Fonds FCAR pour le support financier qu'ils m'ont accordé au long de mes études.

TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xiii
CHAPITRES	
I. INTRODUCTION.....	1
1.1 Récepteur d'énergie.....	1
1.2 Les bactéries halophiles extrêmes.....	1
1.3 Le pigment photochimique: la bactériorhodopsine.....	3
1.4 Photochimie de la bactériorhodopsine.....	5
1.5 Biochimie de la membrane pourpre.....	9
1.5.1 Structure de la membrane pourpre.....	9
1.5.2 Organisation membranaire de la bactériorhodopsine.....	10
1.5.3 Les lipides membranaires des bactéries halophiles.....	12
1.5.4 Monomérisation de la bactériorhodopsine.....	13
1.5.5 Délipidation de la bactériorhodopsine.....	20
1.6 Photochimie de la bR délipidée dans le lauryl sucrose.....	25
1.7 bR480: un chromophore déprotoné ?.....	25
1.8 But du travail.....	31
II. MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES.....	33
2.1 Culture et récolte des bactéries.....	33

2.1.1	Souche bactérienne.....	33
2.1.2	Milieu de culture.....	33
2.1.3	Pré-inoculation.....	34
2.1.4	Inoculation.....	34
2.1.5	Induction de la membrane pourpre.....	35
2.1.6	Récolte des bactéries.....	36
2.1.7	Conservation des souches bactériennes.....	37
2.2	Préparation de la membrane pourpre.....	37
2.2.1	Séparation de la membrane pourpre des débris cellulaires.....	37
2.2.2	Purification de la membrane pourpre.....	38
2.3	Purification de la bactériorhodopsine de la membrane pourpre.....	39
2.3.1	Délipidation de la bactériorhodopsine.....	39
2.3.2	Echange de détergents.....	39
2.3.2.1	Principe de la méthode.....	39
2.3.2.2	Méthode expérimentale.....	40
2.3.3	Préparation de la bR délipidée exempte de détergents.....	40
2.4	Reconstitution bR-détergents.....	41
2.5	Techniques spectroscopiques.....	41
2.5.1	Absorption.....	41
2.5.2	Accessoires de basse température.....	42
2.5.2.1	Méthode expérimentale.....	42
2.5.3	Raman de Résonance.....	43
2.5.3.1	Préparation des échantillons.....	43
2.5.3.2	Méthode expérimentale.....	43

2.5.4	Spectroscopie d'émission.....	44
2.5.5	Photolyse éclair.....	44
2.6	Effet du pH sur la bR délipidée.....	45
2.7	Effet de l'hydroxylamine et du borohydrure de sodium.....	46
2.7.1	Principe.....	46
2.7.2	Méthode expérimentale.....	46
2.8	Produits chimiques.....	47
III.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	48
3.1	Préparation de la membrane pourpre.....	48
3.1.1	Rendement de membranes pourpres.....	48
3.1.2	Analyse spectrale de la membrane pourpre.....	48
3.2	Préparation de la bactériorhodopsine délipidée.....	51
3.2.1	Délipidation de la bR dans le déoxycholate.....	51
3.2.1.1	Rendement de bR délipidée dans le DOC.....	51
3.2.1.2	Analyse spectrale de la bR délipidée dans le DOC.....	52
3.2.1.3	Discussion.....	52
3.2.2	Echange de détergent.....	53
3.2.3	Préparation de la bR délipidée exempte de détergents.....	54
3.2.3.1	Analyse spectrale de la bR délipidée exempte de détergents.....	54
3.2.3.2	Discussion.....	56
3.3	Reconstitutions bR-détergents.....	58
3.3.1	Résultats.....	58
3.3.2	Discussion.....	61

	Page
3.4 Spectroscopie Raman de résonance.....	66
3.4.1 Région C=C.....	67
3.4.1.1 Résultats.....	67
3.4.1.2 Discussion.....	67
3.4.2 Région C=N.....	75
3.4.2.1 Résultats.....	75
3.4.2.2 Discussion.....	76
3.4.3 Région du "fingerprint"(empreinte) du chromophore.....	80
3.4.3.1 Résultats.....	80
3.4.3.2 Discussion.....	80
3.4.4 Discussion générale.....	84
3.5 Spectroscopie d'émission.....	89
3.5.1 Principe.....	89
3.5.2 Résultats.....	89
3.5.3 Discussion.....	91
3.6 Effet de l'hydroxylamine et du borohydrure de sodium.....	93
3.6.1 Principe.....	93
3.6.2 Réaction au borohydrure.....	94
3.6.2.1 Résultats.....	94
3.6.2.2 Discussion.....	94
3.6.3 Réaction à l'hydroxylamine.....	96
3.6.3.1 Résultats.....	96
3.6.3.2 Discussion.....	98
3.7 Photochimie de la bR délipidée.....	103

3.7.1	Photolyse éclair.....	103
3.7.1.1	Résultats.....	103
3.7.2	Spectroscopie à basse température.....	107
3.7.2.1	Résultats.....	108
3.7.2.2	Discussion.....	114
3.8	Adaptation à la lumière de bR480.....	118
3.8.1	Principe.....	118
3.8.2	Résultats.....	119
IV.	DISCUSSION GENERALE.....	124
	BIBLIOGRAPHIE.....	133

LISTE DES FIGURES

	Page
1. Formation de la base de Schiff entre le rétinol et la bactériopsine.....	4
2. Modèle du photocycle de la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre.....	7
3. Séquence des acides aminés et structure de la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre.....	11
4. Structures des lipides polaires principaux.....	14
5. Spectres de dichroïsme circulaire de la bactériorhodopsine native et solubilisée dans les détergents.....	18
6. Structure du lauryl sucrose (L-1690).....	22
7. Variation du λ_{max} et courbe de titration de la bactériorhodopsine purifiée dans le lauryl sucrose en fonction du pH.....	24
8. Schéma de la photochimie de la bactériorhodopsine purifiée dans le lauryl sucrose.....	26
9. Effet de l'alcalinisation de la bactériorhodopsine solubilisée dans le lauryl sucrose par comparaison à la membrane pourpre native.....	28
10. Modèle de charge ponctuelle externe pour la bactériorhodopsine.....	30
11. Spectre d'absorption de la membrane pourpre adaptée à l'obscurité.....	49
12. Effet du pH sur le spectre de la bactériorhodopsine purifiée dans le lauryl sucrose.....	55
13. Spectre d'absorption de la bR délipidée.....	57
14. Courbes de titration de la bR purifiée dispersée dans différents milieux.....	59
15. Effet du milieu utilisé pour effectuer la dispersion sur le maximum d'absorption de la bR purifiée.....	62
16. Spectres Raman de résonance de la bR délipidée.....	68
17. Spectres Raman de résonance de la bR délipidée dispersée dans le lauryl sucrose (bRI480/540ILS).....	69

18. Spectres Raman de résonance de la bR570 à partir d'une suspension aqueuse de membranes pourpres.....	71
19. Spectres Raman de résonance de chromophores modèles ayant des bases de Schiff protonées.....	72
20. Diagramme de corrélation entre les fréquences d'élongation éthylénique des pigments à base de rétinol avec leur maximum d'absorption.....	74
21. Spectres d'émission de la bR délipidée dispersée dans différentes concentrations d'octyl glucoside.....	90
22. Evolution de la bR délipidée en présence de borohydrure de sodium à l'obscurité par comparaison à la MP native(à la lumière).....	95
23. Evolution de la bR délipidée en présence d'hydroxylamine à l'obscurité.....	97
24. Changements spectraux observés lors de l'addition d'hydroxylamine à la bR délipidée dispersée dans le lauryl sucrose à l'obscurité.....	99
25. Changements spectraux observés lors de l'addition d'hydroxylamine à la bR délipidée dispersée dans le Triton X-100 à l'obscurité.....	100
26. Cinétiques d'apparition des méta-intermédiaires de la bR délipidée par comparaison à la bR native.....	105
27. Cinétiques de disparition des méta-intermédiaires de la bR délipidée par comparaison à la MP native.....	106
28. Formation des batho-intermédiaires de la bR délipidée	109
29. Formation du batho-intermédiaire de la bR480.....	110
30. Formation des méta-intermédiaires de la bR délipidée à partir des batho-intermédiaires.....	112
31. Formation des méta-intermédiaires de la bR délipidée par irradiation des échantillons à 220°K.....	113
32. Conversion des méta-intermédiaires de la bR purifiée en leur pigment initial respectif.....	115
33. Adaptation à la lumière de la bactériorhodopsine délipidée.....	120

	Page
34. Spectres de différence enregistrés lors de l'adaptation à la lumière de la bR délipidée par comparaison à la bR native.....	121
35. Adaptation à la lumière de la bR contenue dans la MP native.....	122

LISTE DES ABREVIATIONS

MR	Membrane rouge
MP	Membrane pourpre
bR	Bactériorhodopsine
DC	Dichroïsme circulaire
DOC	Desoxycholate
D.O.	Densité optique
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
bO	Bactériopsine
BS	Base de Schiff
RR	Raman de résonance
DMSO	Diméthyl sulfoxide
Tyr	Tyrosine
Try	Tryptophane
CMC	Concentration micellaire critique
O.G.	Octyl glucoside

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Récepteur d'énergie

La vie sur la terre serait impossible sans le soleil. La capacité d'emmagasinier et d'utiliser cette énergie lumineuse solaire est le privilège des organismes photosynthétiques. Annuellement, l'énergie emmagasinée par ces organismes équivaut à une puissance de 2×10^9 kilowatts, soit environ 10^{13} kilocalories (Rabinovitch et Govindjee 1969). Parmi les systèmes biologiques capables de piéger l'énergie lumineuse, on retrouve certaines souches de bactéries halophiles qui, contrairement aux organismes photosynthétiques chlorophylliens, utilisent la vitamine A comme piège à énergie. Ce pigment est situé dans une partie spécialisée de la membrane cellulaire des halobactéries. L'absorption d'un photon par ce groupement prosthétique déclenche un cycle réactionnel au cours duquel il y a pompage de protons au travers de la membrane. In vivo, le gradient électrochimique créé sert à la synthèse d'ATP; in vitro, ce processus pourrait être utilisé pour convertir l'énergie solaire en une différence de potentiel électrique (Sportelli et Martino, 1982).

1.2 Les bactéries halophiles extrêmes

Les bactéries halophiles extrêmes sont des microorganismes dont le maximum de croissance est atteint à des concentrations de NaCl entre 20 et 30% (Larsen 1962 et 1967, Kushner 1968). Ce sont des organismes de

pigmentation rouge (caroténoïdes) qui s'étendent largement dans les eaux naturelles très salines comme la Mer morte et aussi dans les endroits où le sel est obtenu par l'évaporation solaire de l'eau de mer. Ainsi, leur habitat naturel est d'intense soleil et de concentration basse en oxygène (Bayley et Morton 1978), dû à la faible solubilité de l'oxygène dans les solutions salines.

Les espèces principales de bactéries halophiles sont regroupées en deux genres: Halobacterium et Halococcus dans la famille des Halobacteriaceae (Gibbons 1974). Ce sont les Halobacterium qui ont fait l'objet d'études plus poussées parce qu'elles sont particulièrement sensibles aux basses concentrations de sel dans lesquelles elles se lysent (Abram et Gibbons 1960); il est donc plus facile d'en étudier les constituants cellulaires.

Un trait inhabituel de l'enveloppe des espèces appartenant au genre Halobacterium est l'absence d'acide diaminopimélique, d'acide muramique, de D-aminoacide et d'acide teichoïque; elles ne contiennent pas de peptidoglycan rigide normalement présent chez les bactéries non-halophiles (Brown et Shorey 1963, Kushner et coll. 1964, Kushner et Onishi 1968). Néanmoins, elles possèdent une enveloppe cellulaire constituée d'une structure membranaire composée d'unités typiques avec une paroi cellulaire sur sa surface extérieure (Stoeckenius et Rowen 1967, Cho et coll. 1967). Cette enveloppe cellulaire est extrêmement sensible à la force ionique du milieu. Lorsque les cellules sont suspendues dans l'eau distillée, les enveloppes se désintègrent rapidement en fragments membranaires de grandeurs variables (Kushner et

coll. 1964).

Les fragments de membranes cellulaires peuvent être séparés, par centrifugation différentielle et par gradients de densité, en deux fractions principales: la membrane rouge (MR) contenant la bactériorubérine (un caroténoïde ayant 50 carbones, C_{50}) et la membrane pourpre (MP) composée essentiellement d'une seule protéine: la bactériorhodopsine (bR) (Stoeckenius et Rowen 1967, Stoeckenius et Kunau 1968). La MR prédomine lorsque les bactéries sont cultivées en aérobiose. Par contre, dans des conditions de lumière intense et de basse concentration d'oxygène, elles développent des feuilletts de MP d'environ 0,5 μm de diamètre (Oesterhelt et Stoeckenius 1971) dans la MR. La MP peut ainsi occuper plus de 50% de la surface de la cellule.

1.3 Le pigment photochimique: la bactériorhodopsine

La membrane pourpre contient seulement une protéine: la bactériorhodopsine. Celle-ci est responsable de la couleur pourpre de la membrane qui est attribuable à la liaison covalente entre le rétinol et un résidu lysine de la bactériopsine. Ce lien de base de Schiff résulte de la condensation du groupement aldéhyde du rétinol avec l'amine de la lysine (voir figure 1), (Oesterhelt et Stoeckenius 1971).

La bR est à la base du système de phosphorylation des bactéries halophiles extrêmes. Contrairement aux processus régissant la photosynthèse et la respiration, la fonction de la bactériorhodopsine n'est pas basée sur le transport d'électrons mais repose plutôt sur le transport vectoriel de protons au travers la membrane cellulaire.

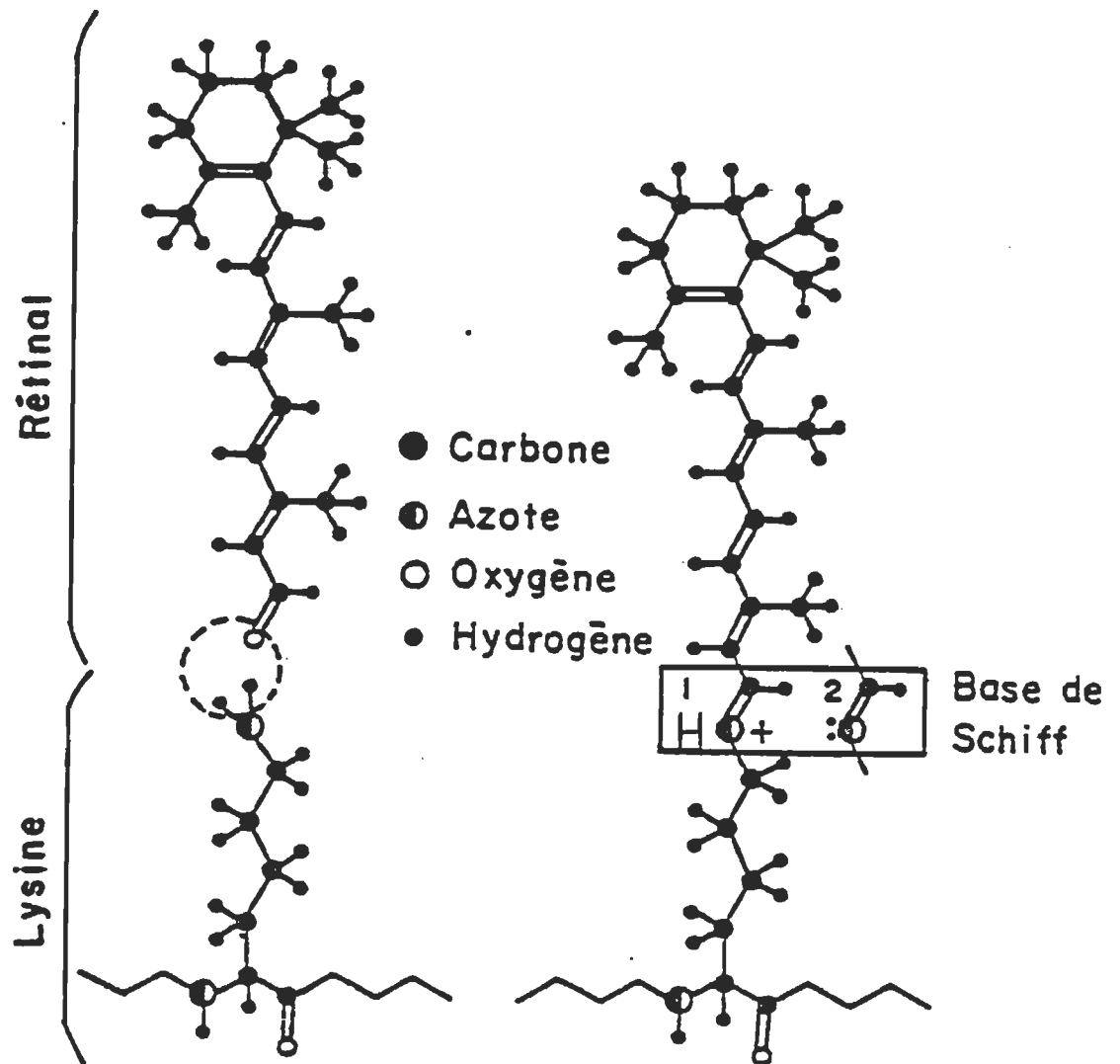


Figure 1: Formation de la base de Schiff entre le chromophore de la bactériorhodopsine, le rétinol et un résidu lysine de la bactériopsine. Lorsqu'ils se combinent, il y a élimination d'une molécule d'eau et la base de Schiff est formée entre les atomes de carbone et d'azote. La base de Schiff perd et regagne un proton dans la photoréaction, alternant entre les deux formes suivantes: protonée (1) et déprotonée (2).

L'énergie nécessaire à la translocation de protons est fournie par la lumière, laquelle est absorbée par le chromophore de la bR: le rétinale. Elle fonctionne ainsi comme une pompe à protons unidirectionnelle, convertissant l'énergie lumineuse en un potentiel électrochimique membranaire (Oesterhelt et Stoeckenius 1973, Danon et Stoeckenius 1974, Racker et Stoeckenius 1974). Ainsi, l'oxydation des substrats par l'oxygène de même que la photoréaction de la bR peuvent tous deux contribuer à créer un gradient électrochimique membranaire. Dans les deux cas, le retour des protons via l'ATPase membranaire est responsable de la synthèse d'ATP (Racker et Stoeckenius 1974) et fournit l'énergie nécessaire aux différents processus métaboliques se produisant dans la cellule.

Ces bactéries possèdent ainsi deux sources bioénergétiques indépendantes: une chaîne respiratoire et la MP. Lorsque le taux de synthèse d'ATP via la phosphorylation oxydative ne suffit plus aux besoins énergétiques de la cellule, la MP se met en opération et rééquilibre la réserve d'énergie sous forme d'ATP.

1.4 Photochimie de la bactériorhodopsine

Un cycle photochimique est relié au transport vectoriel de protons à travers la membrane. La photoréaction de la bR constitue un cycle impliquant la photoisomérisation, l'isomérisation thermique du rétinale, la déprotonation et la reprotonation de la base de Schiff et des changements concomitants dans la conformation de la protéine. Ces différents événements résultent en des changements du spectre d'absorption et peuvent être reconnus par plusieurs intermédiaires

métastables différents tout au long des changements successifs de l'interaction rétinale-protéine (Callender 1982).

La bR existe en deux formes stables: une forme adaptée à la lumière (bR570) avec une bande d'absorption à environ 567nm, et une forme adaptée à l'obscurité (bR560) absorbant à environ 559nm. Ces deux formes sont interconvertibles selon la réaction suivante: $bR560 \xrightleftharpoons{h\nu} bR570$. La réaction directe demande une courte exposition à une source lumineuse intense de longueur d'onde entre 500 et 600nm tandis que la conversion à la forme d'obscurité est une réaction lente ayant une demie-vie d'environ 20 minutes à 35°C (Oesterhelt et coll. 1973). Le passage de bR560 à bR570 implique une isomérisation du 13-cis en tout-trans rétinale. bR560 est un mélange équimolaire des isomères tout-trans et 13-cis (Pettei et coll. 1977) à pH neutre tandis que bR570 contient seulement du tout-trans rétinale (Oesterhelt et coll. 1973). La lumière change donc le rapport molaire vers une prédominance de tout-trans rétinale et l'équilibre est retrouvé par une réaction thermique à la noirceur.

Lorsque la bR adaptée à la lumière (bR570) absorbe un photon, elle se convertit en batho-bactériorhodopsine (batho-trans bR ou bK590) dont la bande d'absorption subit un déplacement bathochrome comparativement à celle de bR570. Elle est formée très rapidement (10^{-12} secondes) et est stable seulement à basse température entre -190° et -120°C (Stoeckenius et Lozier 1974, Tokunaga et coll. 1976). Seules la formation de ce premier intermédiaire et la transformation inverse ($bK590 \rightleftharpoons bR570$) impliquent l'absorption d'un photon; les autres intermédiaires résultent de réactions thermiques (voir figure 2).

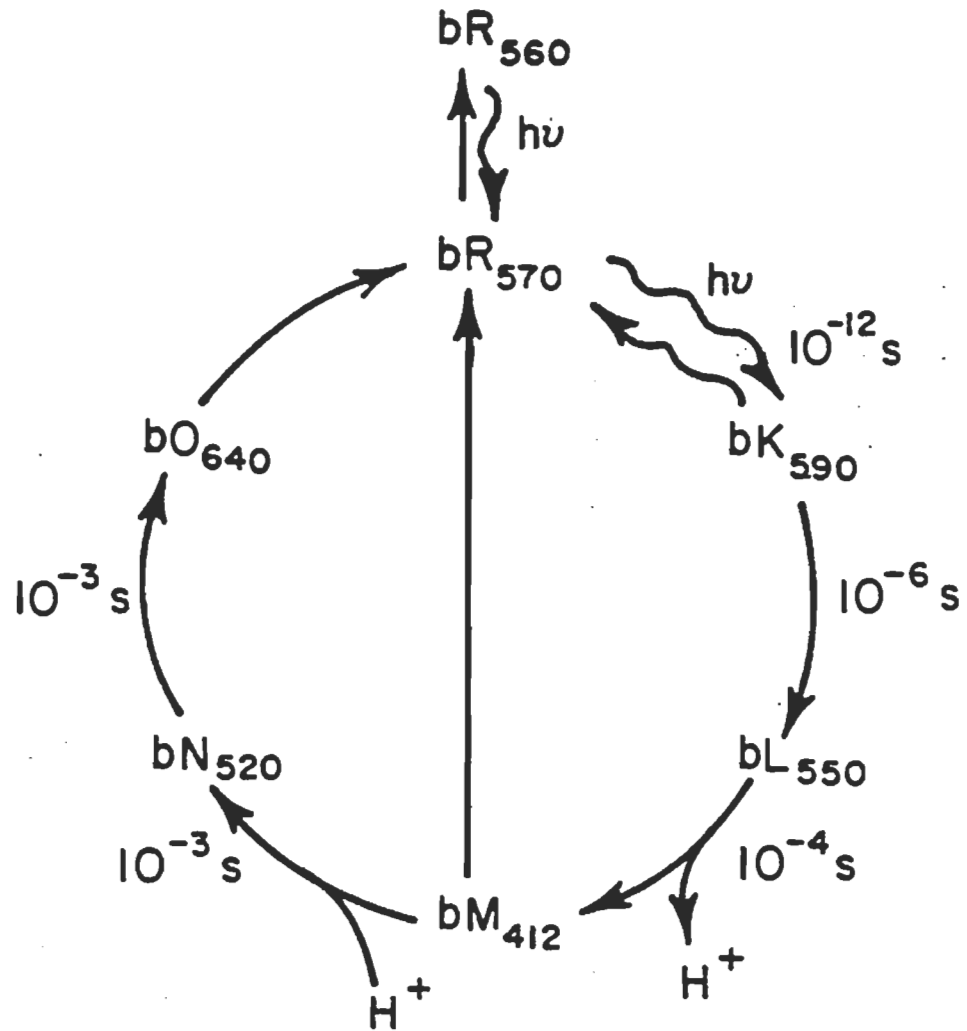


Figure 2: Modèle du photocycle de la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre.

~~~~~> Réaction stimulée par la lumière.

————> Réaction thermique à l'obscurité.

Les maxima d'absorption des intermédiaires sont indiqués par les nombres en indice et les temps correspondent à la demi-vie des intermédiaires à la température de la pièce.

Au cours de la photoréaction de la bactériorhodopsine, un proton est relâché dans le milieu et un proton est repris.

Lorsqu'on réchauffe le batho-intermédiaire, le cycle photochimique est initié (Stoeckenius et Lozier 1974, Litvin et coll. 1975), produisant une lumi-bactériorhodopsine (bL550 ou lumi-bRt) (Iwasa et coll. 1980) stable à des températures inférieures à  $-95^{\circ}\text{C}$ . Si on augmente davantage la température, bL550 se transforme en méta-bactériorhodopsine (bM412 ou méta-bRt) et ce métabroduit est stable entre  $-90^{\circ}$  et  $-50^{\circ}\text{C}$ . Au dessus de cette température, la méta-bR se transforme en son pigment original, bR570, via un ou deux autres intermédiaires, N et O, absorbant vers 520 et 640nm respectivement. Cette dernière partie du photocycle n'est pas très bien résolue.

Par spectroscopie à basse température, Iwasa n'a pas observé d'autres intermédiaires dans le cheminement de méta-bRt à trans-bR (bR570), correspondant aux intermédiaires N et O, qui ont été détectés par photolyse éclair (Dencher et Wilms 1975). Selon Iwasa, il y a deux raisons possibles pour lesquelles les intermédiaires N et O ne sont pas détectés par spectroscopie à basse température. Premièrement, la vitesse de réaction de méta-bRt à N qui est de l'ordre de la milliseconde peut être plus lente que celle de N à O. Dans ces conditions, le temps de vie de N devient très court; il se convertit donc très rapidement au prochain intermédiaire et il devient impossible à détecter avec un spectrophotomètre conventionnel. Ceci peut être aussi vrai pour le cas de O. L'autre raison est que la réaction thermique de méta-bRt peut avoir au moins deux voies de désactivation thermique. Ceci signifie que N et O seraient sur un chemin parallèle à celui du cycle réactionnel principal.

De plus, lumi-bRt semble être relié non seulement à la méta-bRt mais aussi à la trans-bR (Iwasa et coll. 1980) Le rapport entre lumi-bRt à méta-bRt ou trans-bR pourrait dépendre de la température de la réaction.

Lors de la formation photochimique de bM412 (ou méta-bRt), un proton est relâché dans le milieu et lors de la disparition de bM412, un proton est repris. Ceci suggère donc que le transport vectoriel de protons est couplé à une réaction de protonation-déprotonation de la base de Schiff (Lewis et coll. 1974), l'intermédiaire bM412 correspondant à la forme déprotonée.

Le temps du photocycle entier est de 10 millisecondes à une température d'environ 35°C. Le cycle de photoréaction de bR peut être affecté par les solvants, par le pH et par la concentration de sel (Dencher et Wilms 1975); conséquemment la géométrie du chromophore peut être changée.

### 1.5 Biochimie de la membrane pourpre

Pour comprendre un système membranaire au niveau moléculaire, la structure et la fonction de ses parties constituantes, les protéines et les lipides, aussi bien que leurs interactions mutuelles doivent être connues.

#### 1.5.1 Structure de la membrane pourpre

La membrane pourpre a une épaisseur de 48 Å. Elle a une structure en réseau cristallin conférée par un arrangement ordonné de trimères de bR en disposition hexagonale (Unwin et Henderson

1975) dans le plan de la membrane. Ceci donne à la MP une structure extrêmement rigide et immobilise presque entièrement les lipides. On croit que cette structure cristalline contribue en quelque sorte à maintenir l'intégrité de la protéine (Ebrey et coll. 1977, Peters et Peters 1978). De plus, des analyses par diffraction des rayons X et par microscopie électronique suggèrent que les protéines et les lipides sont distribués asymétriquement à travers la MP. (Blaurock et King 1977).

### 1.5.2 Organisation membranaire de la bactériorhodopsine

Le monomère de bR est une protéine globulaire compacte de 26 000 daltons dont la structure est formée par la juxtaposition de 7 hélices  $\alpha$ , ayant chacune 35 à 40 Å de long, perpendiculaires au plan de la membrane et qui s'étendent sur la presque totalité de la bicouche (voir figure 3).

La chaîne polypeptidique de la bR est constituée de 248 acides aminés (Khorana et coll. 1979, Ovchinnikov et coll. 1979), ne contient pas d'histidine ni de cystéine et 70% de ses acides aminés sont hydrophobes. Le côté N-terminal est exposé à la surface extracellulaire et le côté C-terminal est à la surface cytoplasmique (Wallace 1982). La position du chromophore dans la membrane semble être à environ 10 Å de la face cytoplasmique (Thomas et Stryer 1980) où le rétinol est lié à la lysine 216 de la bactériorhodopsine (Stoeckenius 1980).



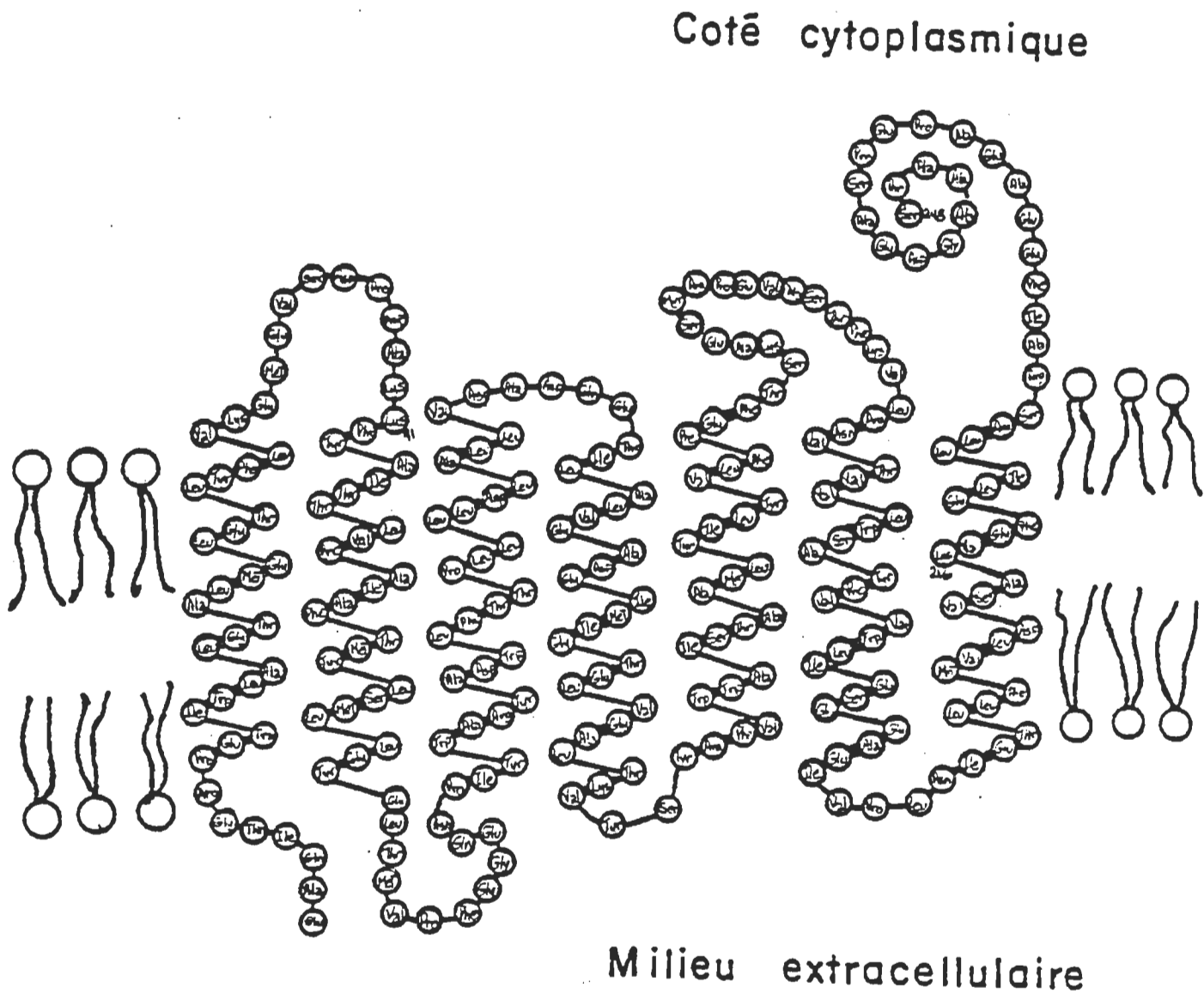


Figure 3: Séquence des acides aminés et structure de la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre, telle que proposée par Khorana et al. (1979).

### 1.5.3 Les lipides membranaires des bactéries halophiles

Les lipides membranaires remplissent les espaces entre les molécules de protéines (Stoeckenius 1980). D'après l'emplacement des trimères de bR dans la membrane pourpre native, il est évident qu'il ne peut y avoir que des contacts protéine-lipide-protéine et qu'il n'y a donc pas d'interactions directes protéine-protéine entre les trimères (Glaeser et coll. 1985). Les molécules lipidiques doivent donc adopter des positions relativement précises par rapport aux molécules de protéines. Les modèles proposés supposent que les trimères de protéines sont complètement entourés par une couche limitante de lipides ayant une épaisseur maximale d'une molécule de lipide (Jost et coll. 1978, Glaeser et coll. 1985).

La membrane pourpre contient près de 80% de bR et 20% de lipides, ce qui correspond à 7 molécules de lipides par molécule de protéine (Kates et coll. 1982). La plupart des lipides de la MP ont une charge négative et on leur attribue une fonction de régulation de l'activité de pompage de protons consécutive à l'absorption de la lumière par la bR.

En plus des phospholipides qui constituent la majeure partie des lipides membranaires, les halobactéries contiennent un sulfate d'un glycolipide (inhabituel dans la nature) ne se retrouvant que dans la membrane pourpre. Kates (1972) et Kates et Kushwaha (1976) ont démontré que les lipides polaires constituent environ 90% des lipides totaux. Une propriété inhabituelle de la membrane cellulaire

est qu'ils sont tous dérivés d'un diéther de glycérol dans lequel les chaînes hydrocarbonnées sont des groupements phytanyles: 2,3-di-O-phytanyle-sn-glycérol, tandis qu'on retrouve communément au point de vue biologique des esters d'acide gras et de glycérol (Kates 1972). Le groupement phytanyle est une chaîne saturée composée de quatre unités isoprènes. Les phospholipides majeurs (voir figure 4) sont des analogues du diphytanyl glycérol éther de phosphatidyl glycérophosphate (I), phosphatidyl glycérol (II) et phosphatidyl glycérosulfate (III), ce dernier n'étant pas présent dans la membrane rouge.

Les lipides neutres sont constitués principalement de squalènes, dihydro et tétrahydrosqualène, vitamine MK-8, diphytanyl glycérol éther et de pigments variés. Ces derniers sont caractéristiques des halophiles extrêmes (Kushwaha et coll. 1974) où l'on retrouve les caroténoïdes contenant 50 carbones (bactériorubérine) seulement dans la membrane rouge (Kushwaha et coll. 1975b) tandis que le rétinol n'est présent que dans la MP.

#### 1.5.4 Monomérisation de la bactériorhodopsine

Particulièrement dans le cas de la membrane pourpre des halobactéries, l'étude des interactions protéine-protéine et protéine-lipide semble être d'une importance considérable pour au moins deux raisons. En premier lieu, nous avons vu que les lipides sont quelques peu inhabituels puisque leurs chaînes hydrocarbonnées ne sont pas des esters d'acides gras et de glycérol mais plutôt des chaînes isoprènes saturées ayant 20 carbones liées à la moitié

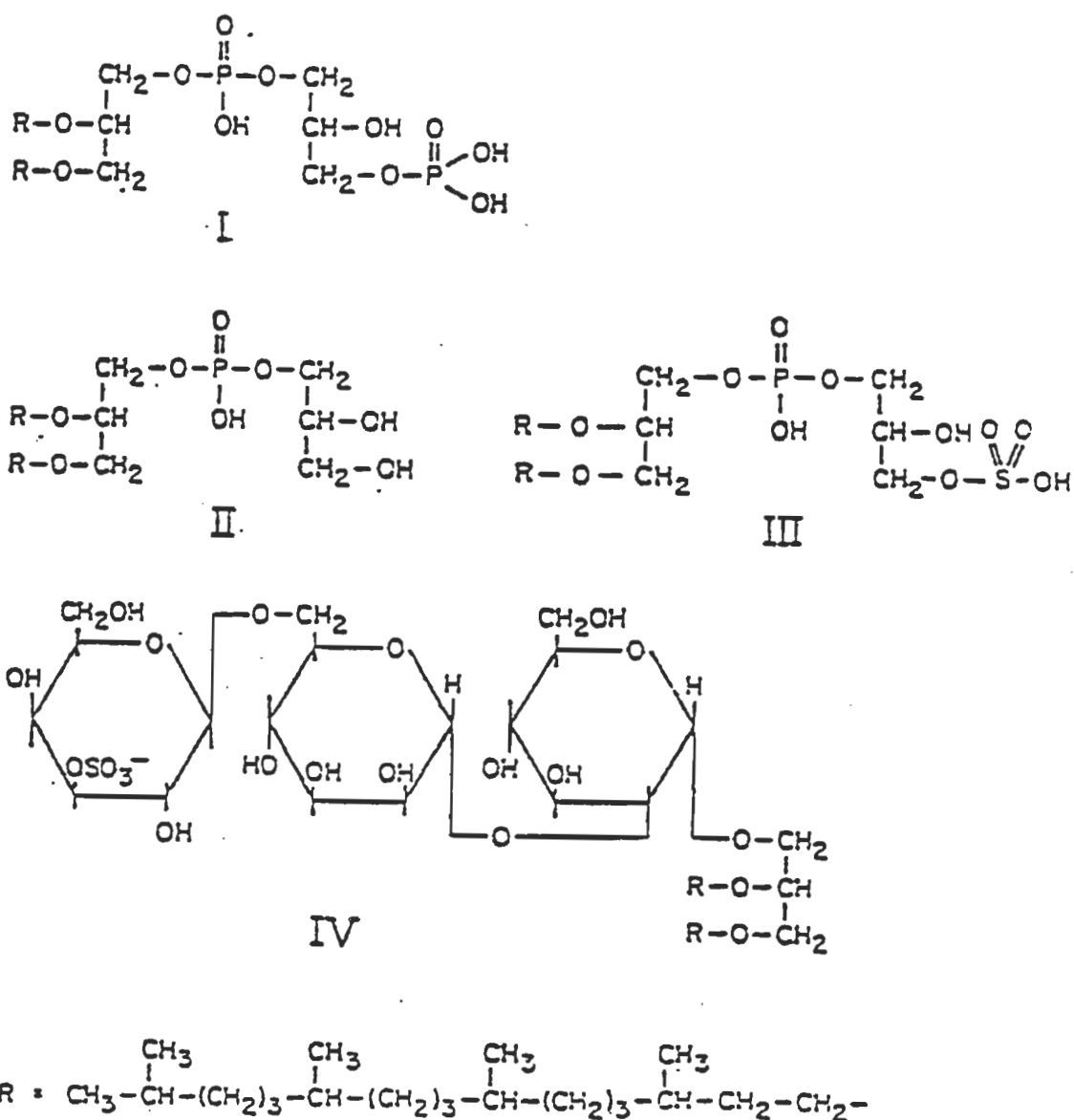


Figure 4: Structures des lipides polaires principaux d'après Kates et al. (1982).

I Phosphatidyl glycérophosphate

II Phosphatidyl glycérol

III Phosphatidyl glycérosulfate

IV Sulfate de glycolipide

glycérol par des liens éther (Kates et Kushwaha 1976). Deuxièmement, nous savons que la bR est l'unique protéine de la MP et qu'elle a une organisation particulière en trimères formant un réseau hexagonal à deux dimensions (Blaurock et Stoeckenius 1971, Henderson et Unwin 1975). Du à cet arrangement unique des molécules de bR, la question à savoir quelle est l'unité fonctionnelle de base s'est posée: Est-ce le trimère ou le monomère? La connaissance de l'unité fonctionnelle est requise pour l'élaboration d'un modèle du système et n'importe quelle différence observée entre l'efficacité de la bR monomérique et la bR agrégée dans la MP peut aider à comprendre cette pompe à protons au niveau moléculaire.

La première approche pour répondre à cette question a été de solubiliser le réseau cristallin de bR par des traitements avec certains détergents afin de désagréger la MP et d'obtenir de la bR sous forme de monomères pour ensuite pouvoir examiner les propriétés de cette dernière par une variété de méthodes biochimiques et biophysiques (Heyn et coll. 1975, Reynolds et Stoeckenius 1977, Dencher et Heyn 1978, Casadio et coll. 1980).

Cependant, le problème qui s'est posé avec la bR est que, contrairement au pigment visuel de la rhodopsine, cette protéine possède une stabilité relativement faible dans la plupart des détergents commerciaux disponibles lorsque ceux-ci sont utilisés à des concentrations suffisantes pour effectuer la solubilisation. Jusqu'ici, la plupart des travaux concernant cet aspect se sont heurtés à deux obstacles majeurs soient: la difficulté de

solubiliser la MP afin de délipider la bR et l'instabilité de la bR dans beaucoup de détergents. En effet, la bR est une protéine très stable dans une vaste gamme de température et de pH lorsqu'elle est contenue dans la membrane pourpre mais elle devient une protéine très fragile lorsqu'on solubilise celle-ci. La vitesse à laquelle les processus de solubilisation et de dégradation de la bR se produisent varie énormément d'un détergent à l'autre, quoique la vitesse de solubilisation de la MP varie proportionnellement avec le degré de dénaturation de la bR dans les différents détergents; c'est-à-dire que les détergents qui solubilisent bien la MP dénaturent aussi bien la bR.

Quelques détergents anioniques ont été utilisés (Padros et coll. 1984), mais les meilleurs résultats ont cependant été obtenus avec les détergents non-ioniques, lesquels simulent le milieu hydrophobe de la bicouche lipidique (Helenius et Simons 1975, Tanford et Reynolds 1976), comme le Triton X-100 (Heyn et coll. 1975, Becher et Ebrey 1976, Reynolds et Stoeckenius 1977, Dencher et Heyn 1978, Casadio et coll. 1980, Lam et Packer 1983), l'octyl glucoside (Dencher et Heyn 1978, Lam et Packer 1983) et le lauryl sucrose (Naito et coll. 1981, Baribeau et Boucher 1985).

L'état d'agrégation de la bR dans les détergents peut être vérifié par la mesure des spectres de dichroïsme circulaire (Heyn et coll. 1975, Becher et Ebrey 1976). En effet, dans la MP native, les molécules de protéines sont regroupées en trimères de bR et il semble qu'il y ait des interactions entre les différents

chromophores. Ces interactions rétinale-rétinale (exciton) entre les chromophores dans l'état trimérique donne naissance à un couplage excitonique, dans la région visible du spectre de dichroïsme circulaire (DC) de la bR, consistant en une bande positive ayant un maximum à environ 535nm et une bande négative ayant un extremum à environ 600nm. La disparition de ce couplage excitonique est considérée comme une évidence de la dissociation du trimère en monomères de bR et a été observée dans le Triton X-100 (Hwang et Stoeckenius 1977, Dencher et Heyn 1982), dans l'octyl glucoside (Denger et Heyn 1978) et également dans le lauryl sucrose (figure 5). L'état monomérique est également caractérisé par une bande DC positive centrée au maximum d'absorption: cette bande DC intrinsèque est le résultat de l'interaction du rétinale avec la bactérioropsine (Heyn et al 1975). De plus, ces observations sur l'état d'agrégation peuvent être vérifiées par des expériences de centrifugation puisque la bR monomérique dans les détergents ne sédimente pas lorsqu'elle est soumise à une force de 200 000g pendant 45 minutes (Denger et Heyn 1982).

En plus de monomériser la protéine, ces détergents affectent les interactions rétinale-protéine de telle sorte qu'ils induisent des changements dans les spectres d'absorption. En effet, les détergents non-ioniques induisent tous un déplacement hypsochrome d'environ 10-20nm de l'absorption du rétinale dans la bR (Huang et coll. 1980, Dencher et Heyn 1978, Lam et Packer 1983, Naito et coll. 1981). Des études effectuées par Lam et Packer (1983) suggèrent fortement que ce déplacement résulte d'altérations dans les

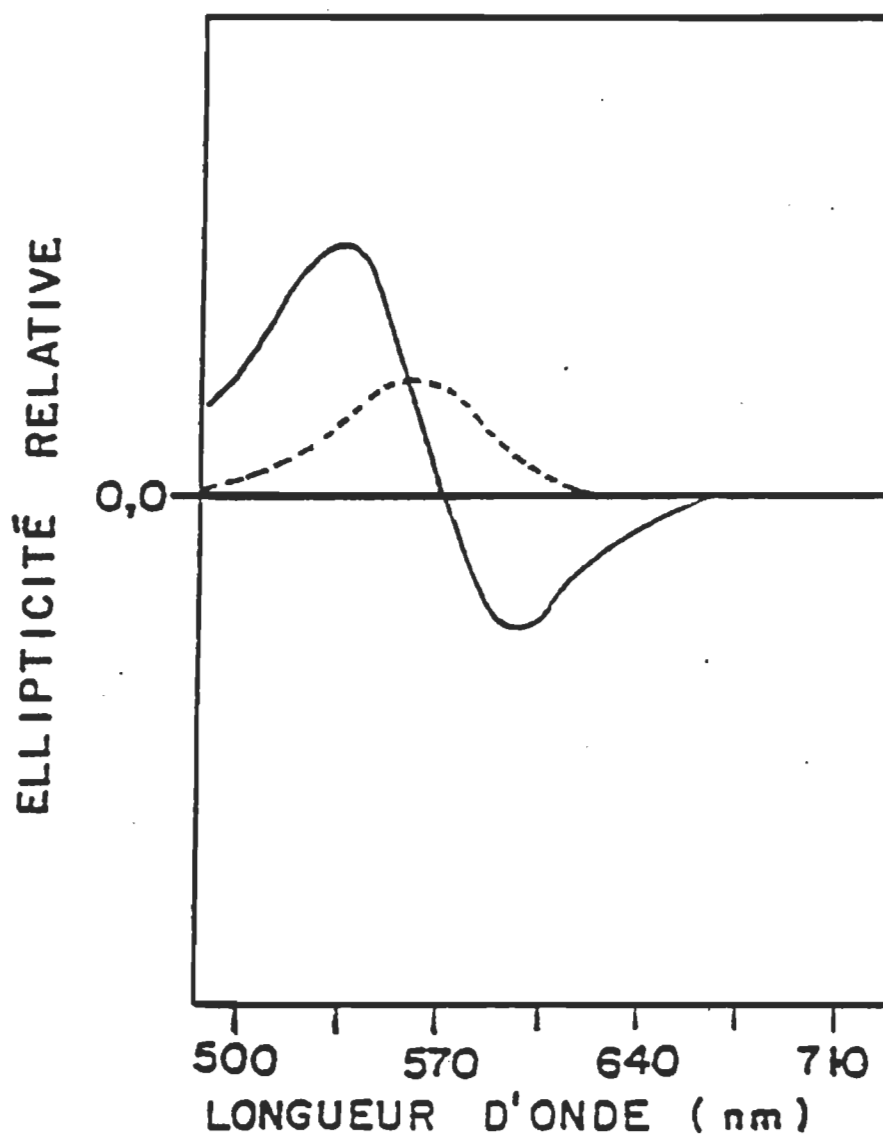


Figure 5: Atténuation du couplage excitonique, observé par dichroïsme circulaire, lors de la solubilisation de la bactériorhodopsine.

(—) Dichroïsme circulaire de la membrane pourpre dans un tampon phosphate 50mM (pH=7).  $A_{560} = 0,7$ .

(---) Même échantillon en présence de détergents.



interactions rétinale-apoprotéine en présence des détergents. En effet, dans le but de caractériser les interactions existant entre les détergents et la bR, Lam et Packer ont traité les MP avec du glutaraldéhyde avant leur solubilisation dans les différents détergents non-ioniques. Le glutaraldéhyde (un agent pontant) préserve la structure trimérique native de la MP, même lorsqu'elle est en présence des détergents et cet effet est remarqué par la conservation de la bande excitonique du spectre de dichroïsme circulaire. Malgré la différence de l'état d'agrégation des molécules de bR dans les échantillons de MP non traités (monomères) ou traités au glutaraldéhyde (trimères), ces chercheurs ont observé un déplacement hypsochrome de la bande d'absorption comparable dans les deux cas. Ainsi, la monomérisation ne semble pas être responsable des changements observés dans les caractéristiques spectroscopiques de la bR. Les effets se manifestant après la solubilisation des MP par les détergents non-ioniques ont donc été attribués à des interactions ayant lieu entre le détergent et la bR.

Toutefois, ces modifications de l'état d'agrégation et des interactions rétinale-protéine ne privent pas la bR de sa capacité d'adaptation à la lumière, quoique celle-ci semble être légèrement affectée par la monomérisation (Dencher et Heyn 1978, Casadio et coll. 1980). De même, le cycle photochimique de la bR diffère très peu dans l'état solubilisé et l'état natif, ce qui indique que les interactions protéine-protéine affectent très peu ces propriétés (Dencher et coll. 1983). Les mêmes intermédiaires sont observés pour

les deux systèmes de bR monomères et agrégées; cependant les cinétiques de réactions sont altérées. Après le traitement de la bR avec les détergents, la formation de l'intermédiaire bM412 est beaucoup plus rapide que dans la membrane native (trois fois plus rapide) tandis que la vitesse de disparition de bM412 est environ la même ou plus rapide dans le Triton X-100 et l'octyl glucoside respectivement (Dencher et Heyn 1978); le photocycle est donc accéléré.

La solubilisation ne provoque pas de changements majeurs dans la structure secondaire de la bR. De même que dans la MP native (Henderson et Unwin 1975), la bR solubilisée contient environ 70% d'hélices  $\alpha$  dans le Triton X-100 (Reynolds et Stoeckenius 1977) et l'octyl glucoside (Dencher et Heyn 1978).

La bR monomérique est capable d'effectuer la translocation de protons (Dencher et Heyn 1979) et également de générer une différence de potentiel électrochimique du même ordre de grandeur que la bR dans la MP (Casadio et Dencher 1981).

#### 1.5.5 Délipidation de la bactériorhodopsine

Les investigations sur la fonction et les propriétés des protéines membranaires intégrales comme la bR requièrent généralement leur isolation et leur purification. La procédure de purification est habituellement accompagnée par une délipidation de la protéine membranaire avec l'aide de détergents. Parmi toutes les méthodes qui ont été expérimentées dans le but de séparer les

lipides membranaires de la bR, le meilleur degré de délipidation a été obtenu par la procédure mise au point par Huang et coll.(1980). Il s'agit d'une technique chromatographique permettant d'enlever 99% des lipides endogènes. La méthode consiste à solubiliser la MP dans le Triton X-100 pour ensuite la déposer sur un tamis moléculaire sur lequel la purification s'effectue. L'élution de la bR est réalisée avec une solution d'un autre détergent: le desoxycholate (DOC). La bR résultant de cette filtration sur gel d'agarose est ainsi en solution dans le DOC. Le maximum d'absorption de la bR est déplacé vers le bleu à partir de 565nm dans la MP intacte à 538nm dans la forme délipidée dans le DOC (Huang et al 1980, Bayley et coll. 1982, Pabst et coll. 1984).

Il est également possible d'obtenir des échantillons de bR délipidée en solution dans un autre détergent, le lauryl sucrose (Baribeau et Boucher 1985).Celui-ci est un ester d'acide laurique et de sucrose (figure 6) et n'est malheureusement pas disponible en tant que produit pur; il contient principalement des monoesters mais aussi des di- et tri-esters et peut être révélé en 5 à 8 "taches" par chromatographie sur couche mince (DeGrip 1982). Cependant, ce détergent semble très doux, efficace pour disperser les membranes photoréceptrices (Nashima et coll. 1978) et mime quelques propriétés des phospholipides (Nashima et coll. 1980).Les échantillons de bR purifiée dans le lauryl sucrose peuvent être obtenus en ajoutant, à la méthode de délipidation de Huang et coll. jusqu'ici incontestée, une autre technique nous permettant d'échanger les détergents utilisés lorsqu'on a des préparations de bR. Cette méthode consiste

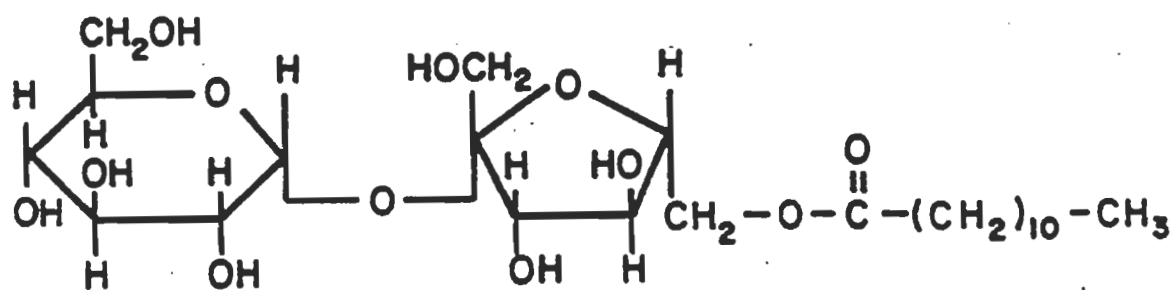
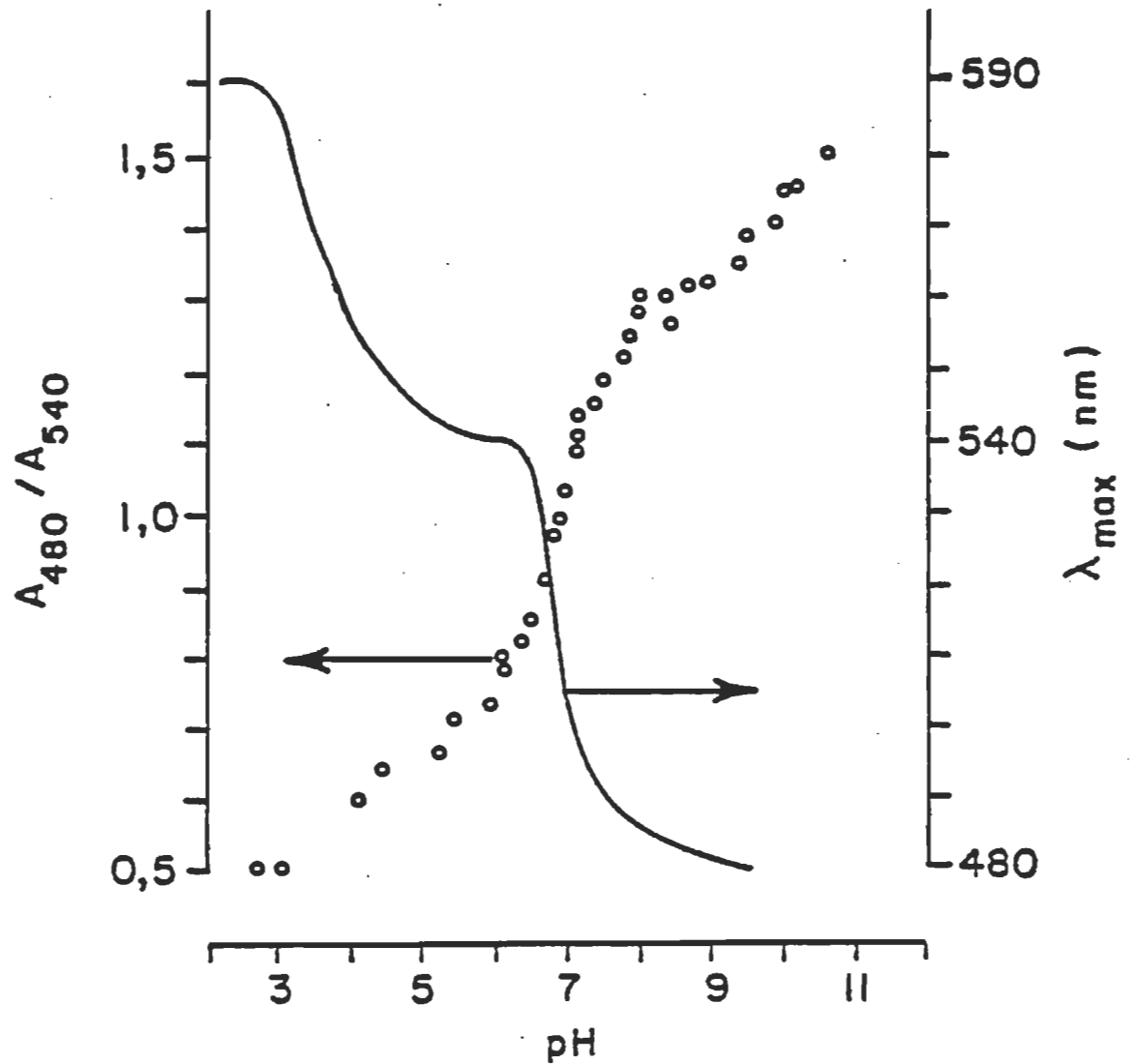


Figure 6: Structure du lauryl sucrose (L-1690).

à substituer le DOC par le lauryl sucrose par chromatographie hydrophobe sur gel de phényl Sépharose, puisque la bR interagit avec ce support hydrophobe. La bR éluée dans le lauryl sucrose ne contient pas de quantité détectable de lipides membranaires (Baribeau, 1984) et est très stable: elle ne montre pas de dégradation sur une période de quelques mois lorsqu'elle est gardée à 4°C sous des conditions de pH modéré. Comme la bR délipidée dans le DOC, la bR purifiée dans le lauryl sucrose montre une bande d'absorption centrée vers 540nm à pH 6 et la propriété d'adaptation à la lumière dans cette forme de bR est toujours existante.

Cependant, tandis que dans la membrane pourpre la bR a une bande d'absorption toujours située à 560nm indépendamment de la valeur du pH entre 5 et 10, la bR purifiée dispersée dans le lauryl sucrose possède une caractéristique particulière, à savoir un effet très marqué du pH sur la position de sa bande d'absorption. A pH 7, la bR délipidée montre toujours une bande d'absorption large et mal résolue dans la région de 500nm, laquelle est rapidement déplacée vers 480nm ou 540nm selon l'alcalinisation ou l'acidification du milieu, respectivement. Le pKa apparent de l'équilibre entre ces deux formes spectrales est d'environ 6,8 (figure 7). Cette réaction de titration est réversible d'une forme spectrale à l'autre à l'obscurité. Dans cette étendue de pH, un tel changement spectral n'a jamais été cité pour les MP solubilisées et ce phénomène n'a pas non plus été observé dans les préparations de bR qui ne sont pas complètement délipidées (Baribeau et Boucher 1985).



**Figure 7:** Rapport des absorbances à 480nm et 540nm (o-o-o) et position du  $\lambda_{max}$  (—) en fonction du pH des échantillons de bactériorhodopsine purifiée dans le lauryl sucrose, acidifiée ou alcalinisée par l'addition graduelle de 0,1 N de HCl ou NaOH.

### 1.6 Photochimie de la bR délipidée dans le lauryl sucrose

La bR purifiée peut exister sous deux formes spectrales distinctes: bR480 et bR540. L'analyse des propriétés photochimiques de ces formes spectrales a été effectuée afin de mieux caractériser la bR480 par rapport à la bR540 (Baribeau et Boucher 1985). Par irradiation de bR540 et bR480 (au moyen de deux filtres interférentiels ayant une bande passante étroite à 550 et 450nm) à la température de l'azote liquide, on forme deux batho-intermédiaires différents: la batho-bR605 et la batho-bR535 respectivement (figure 8). Ces deux formes de bR ainsi que leurs batho-produits ne semblent pas interconvertibles entre eux, du moins à 77°K. Et ces deux batho-intermédiaires se reconvertissent à leur pigment initial respectif par irradiation des échantillons à 77°K. Les déplacements spectraux sont semblables à ceux qui se produisent lors de la formation du batho-produit de la bR contenue dans sa membrane native. Cependant, par l'irradiation des deux formes, bR540 et bR480, à une température de -50°C ou bien en réchauffant les deux différents batho-intermédiaires on obtient un même méta-intermédiaire absorbant à 385nm comparativement à une valeur de 410nm pour la MP native ou solubilisée dans le lauryl sucrose. En revenant à la température de la pièce, on retrouve le mélange original de bR540 et/ou bR480 dépendant du pH des échantillons.

### 1.7 bR480: un chromophore déprotoné ?

Récemment, Druckmann et coll.(1982) ont rapporté l'existence d'un équilibre acido-basique entre deux formes spectrales de bR dans la MP. Dans ce cas, la bR native adaptée à l'obscurité (bR560) pouvait être

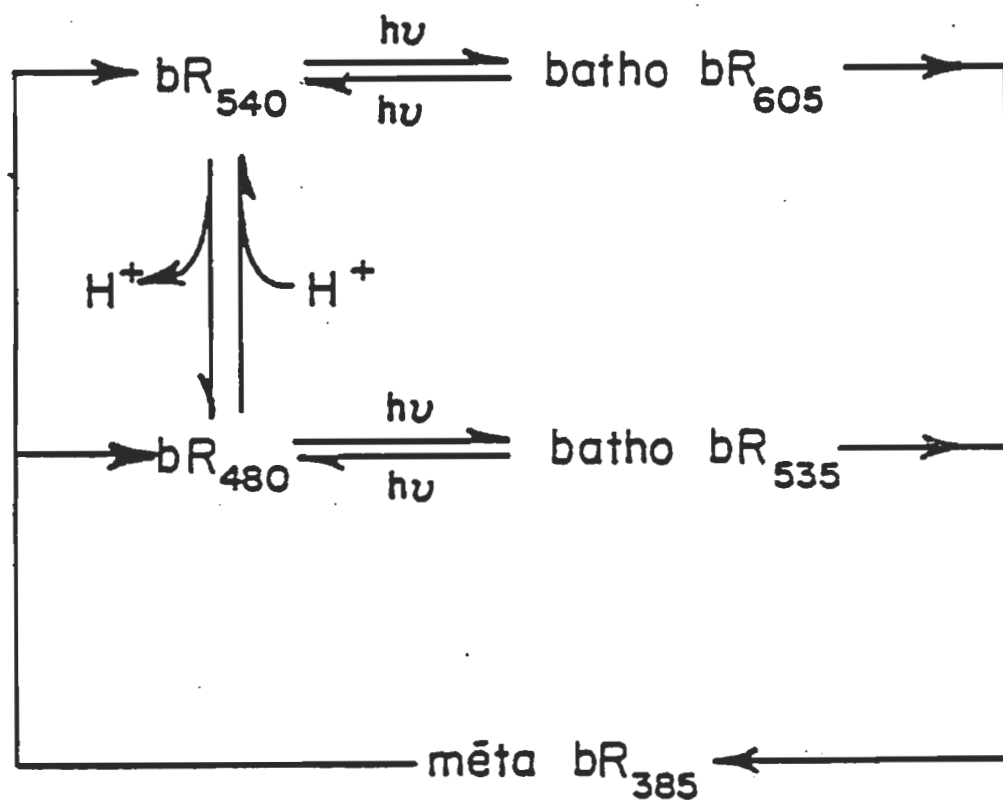


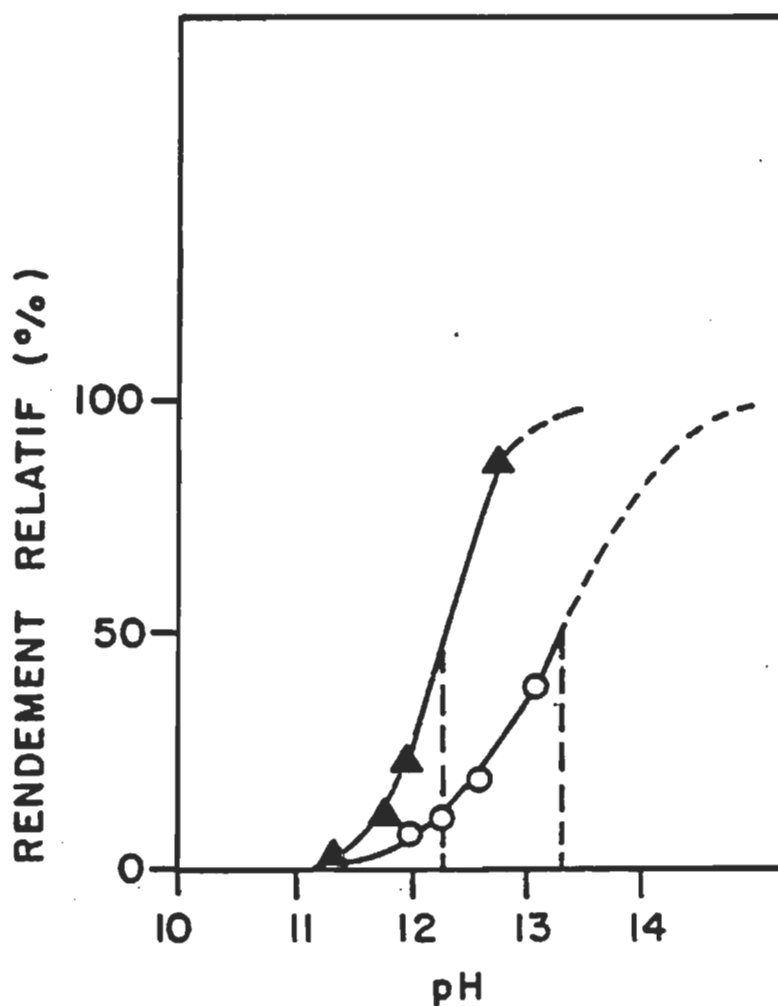
Figure 8: Schéma de la photochimie de la bactériorhodopsine purifiée dans 0,2% (p/v) de lauryl sucrose.

Les réactions lumineuses sont identifiées par  $h\nu$ .



titrée réversiblement en une bR460 désignée d'après le spectre de différence entre les deux formes. Cette transition montre un pKa apparent de 13,3. De plus, si on s'intéresse au groupement directement impliqué dans le site de titration entre les deux formes de bR, une comparaison entre les spectres Raman de résonance de ces deux formes spectrales indique que la formation de bR460 correspond à la déprotonation du lien de base de Schiff entre le rétinale et la bactériorhodopsine.

Une interprétation similaire pourrait être suggérée dans le cas de la bR480 mais nous n'avons présentement aucune évidence expérimentale directe nous permettant d'identifier la nature réelle du groupement titrable en cause dans la bR purifiée qui possède un pKa de 6,8. Cependant, l'équilibre acido-basique entre bR540 et bR480 existe à un intervalle de pH considérablement plus alcalin (figure 9) dans la membrane pourpre native (pKa=13,3) ou solubilisée (pKa>12), comparativement au même équilibre dans la bR délipidée. Ces valeurs de pKa sont très éloignées et il semble que 13,3 soit une valeur de pH très élevée pour la déprotonation de la base de Schiff; on imagine mal comment une protéine puisse garder toute son intégrité structurale à une telle valeur de pH. Particulièrement si on considère que le pKa d'une base de Schiff d'un chromophore modèle en solution est autour de 6,5 (Favrot et coll. 1978), la valeur de 6,8 obtenue pour la bR délipidée apparaît beaucoup plus réaliste pour la déprotonation de la BS dans la bactériorhodopsine. Il pourrait être logique de penser que, dans la bR purifiée, la position de la bande d'absorption soit contrôlée par un groupement qui est accessible à la titration acido-basique lorsque les lipides sont absents. Ce groupement pourrait être beaucoup plus difficile



**Figure 9:** Effet de l'alcalinisation de la bactériorhodopsine solubilisée dans 2% de L-1690 (▲-▲-▲) par comparaison avec la membrane pourpre native (○-○-○). Cette dernière courbe de titration a été calculée par Druckmann et al. (1982) et montre un pKa apparent de 13,3. La courbe de titration de la BR solubilisée a été normalisée à celle de Druckmann et al.; elle montre un pKa apparent de 12,5. L'ordonnée (rendement relatif) correspond à la concentration relative de BR480.

à atteindre dans les MP natives ou solubilisées, c'est-à dire lorsque les lipides sont présents dans l'environnement de la protéine puisqu'il faut des valeurs de pH autour de 13 pour réaliser la transition entre les deux formes spectrales.

L'apparition de bR480 à des valeurs de pH près de la neutralité peut s'expliquer par deux sortes de processus: en premier lieu, il pourrait s'agir de la titration d'un groupement dans l'environnement du chromophore, ou deuxièmement, ce pourrait être le chromophore lui-même qui soit titré. Si on se réfère au modèle de charge ponctuelle externe généralement accepté pour la bR (Nakanishi et coll. 1980), le maximum d'absorption du chromophore peut s'expliquer en considérant que la base de Schiff entre le rétinale et la bactérioropsine est protonée, que la charge positive de l'azote est stabilisée par un contre-ion négatif situé à environ 3 Å de l'atome d'azote et qu'une charge négative additionnelle est située à environ 3,5 Å de l'anneau  $\beta$ -ionone du rétinale, ces deux charges négatives responsables du déplacement spectral étant fournies par le squelette polypeptidique de la bactérioropsine (figure 10). Le déplacement spectral ayant lieu quand bR480 est formé à partir de bR540 a une valeur de 2 315  $\text{cm}^{-1}$ , ce qui correspond environ à la moitié du déplacement total observé lorsqu'on lie le rétinale à la bactérioropsine (4 870  $\text{cm}^{-1}$ ) (Nakanishi et coll. 1980). Si on se fie au modèle de charges ponctuelles externes, cette valeur de 2 315  $\text{cm}^{-1}$  pourrait correspondre à la neutralisation d'une des deux charges négatives. Cependant, on peut difficilement concevoir qu'un acide aminé chargé négativement puisse perdre sa charge lors de l'alcalinisation. L'alternative serait de considérer que bR480 est un chromophore dont la base de Schiff est

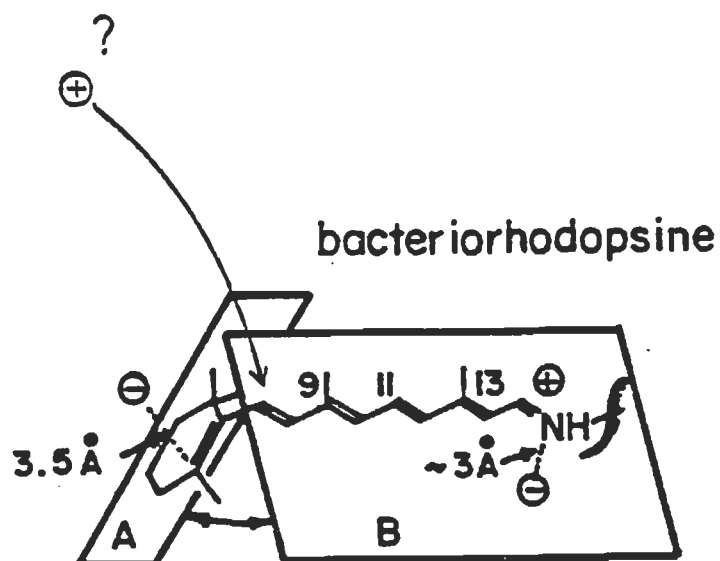


Figure 10: Modèle original de charge ponctuelle externe proposé par Nakanishi (1980) pour la bactériorhodopsine. Il y a un angle de 45° entre l'anneau  $\beta$ -ionone et la chaîne du polyène. Deux charges négatives sont situées à 3 Å de l'azote protoné et à 3,5 Å du carbone 5 de l'anneau respectivement.

Ce modèle a été révisé par Lugtenburg et al. en 1986. Ces auteurs proposent qu'une charge positive est également présente près du carbone 7.

déprotonée.

On pourrait donc supposer qu'une interaction lipide-protéine a lieu, protégeant le site de la titration, donc protégeant le chromophore de bR dans la membrane pourpre native, de telle sorte qu'il faut atteindre des valeurs de pH très alcalin causant ainsi la dénaturation de la protéine et rendant le site de la titration accessible pour observer l'équilibre entre les deux formes spectrales de bR.

### 1.8 But du travail

A long terme, les travaux de notre laboratoire visent à caractériser les interactions moléculaires qui président à la transformation de l'énergie par les pigments biologiques. Il ne fait aucun doute que l'analyse photochimique et biochimique de la bR purifiée permettra de mieux comprendre l'aspect moléculaire de la transduction énergétique par cette protéine.

Dans la membrane pourpre, la bR est fortement associée à son environnement lipidique. Nous venons de poser l'hypothèse selon laquelle le site de la titration dans la bR purifiée est le lien de la base de Schiff et que ce site de réaction est protégé par les lipides membranaires. L'objet de ce travail est donc de déterminer la nature du site de la titration qui est responsable de l'apparition de l'équilibre entre les deux formes spectrales (bR480 et bR540) et quelles sont les propriétés de l'environnement lipidique de la bR native qui sont impliquées dans la production des comportements spectraux altérés qui sont observés lors de la délipidation de la bactériorhodopsine.

Afin de préciser l'importance que pourraient avoir ces associations lipide-protéine dans le maintien de l'activité et de l'intégrité de la protéine, nous présentons une étude de caractérisation de la bactériorhodopsine délipidée ainsi que de son incorporation dans différents détergents. L'analyse des propriétés biochimiques et photochimiques de cette forme purifiée de bR et de la bR reconstituée permettra de connaître l'effet de la délipidation sur la bR et de voir l'importance éventuelle du rôle que jouent les lipides dans le contrôle de l'état de la bactériorhodopsine.

## CHAPITRE II

### MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

#### 2.1 Culture et récolte des bactéries

##### 2.1.1 Souche bactérienne

Ce travail a été possible grâce à l'acquisition d'une souche bactérienne appartenant à la famille des Halobacteriaceae plus précisément au genre Halobacterium (Gibbons N.E. 1974): la souche mutante Sq de Halobacterium halobium provenant du Dr Walther Stoeckenius (Université de la Californie à San Francisco).

##### 2.1.2 Milieu de culture

La technique utilisée pour la préparation du milieu de culture ainsi que pour la culture même des bactéries est celle de Kushwaha et coll. (1975a). La culture de ces bactéries nécessite un milieu de composition un peu particulière. Pour obtenir 1 litre de ce milieu, les produits suivants sont dissous dans de l'eau distillée par ordre d'apparition:

- |                                                                                                                                                                  |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1) NaCl                                                                                                                                                          | 250g |
| 2) KCl                                                                                                                                                           | 2g   |
| 3) $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Na citrate)                                                                           | 3g   |
| 4) $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$                                                                                                                    | 20g  |
| 5) 1 ml d'une solution contenant 0,5g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , dans 10ml de $\text{H}_2\text{O}$ qu'on acidifie avec 3 gouttes de HCl 1N. |      |

Le pH du mélange est ajusté à pH 6,5-6,7 et cette solution

est stérilisée par autoclavage.

- 6) Oxoid peptone (bacteriological peptone) 10g. Les peptones sont ajoutées après la stérilisation.

### 2.1.3 Pré-inoculation

La première étape de croissance bactérienne s'effectue de la manière suivante:

- a) Deux boucles pleines de bactéries provenant de la souche de départ (gélose ensemencée) sont inoculées dans 100ml de milieu de culture contenu dans un Erlenmeyer de 500ml. Deux aliquots de ce type sont préparés.
- b) La croissance est d'environ trois à quatre jours et s'effectue dans un incubateur muni d'un plateau d'agitation rotatoire (New Brunswick Scientific Co., Inc.) à une vitesse d'agitation de 180 r.p.m. et à température contrôlée soit de 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique lue à 660nm d'environ 1. A ce moment, la fin de la phase exponentielle de croissance est atteinte pour ce volume de culture.

### 2.1.4 Inoculation

Afin d'augmenter la population de bactéries, nous procédons maintenant à la phase d'inoculation qui consiste à accroître peu à peu le volume du milieu de culture pour permettre aux bactéries d'avoir un environnement frais, toujours rempli des nutriments nécessaires à leur croissance. Cette étape s'effectue comme suit:



- a) Deux Erlenmeyers de 4 000ml contenant 1 200ml de milieu sont ensemencés, chacun avec l'inoculum de 100ml obtenu en 2.1.3 (b).
- b) La croissance dure environ trois jours jusqu'à ce que la densité optique à 660nm (D.O.660) soit environ égale à 1, dans les mêmes conditions qu'en 2.1.3 (b).
- c) Par la suite, on inocule six Erlenmeyers de 4 000ml contenant chacun 1 600ml de milieu avec 400ml de l'inoculum obtenu en 2.1.4 (b).
- d) Les microorganismes se reproduisent et croissent pendant trois jours toujours dans les mêmes conditions qu'en 2.1.3 (b).

#### 2.1.5 Induction de la membrane pourpre

A la toute fin de la phase exponentielle de croissance, lorsque le nombre de bactéries est maximal, nous entreprenons l'étape de la culture, où par des changements de conditions expérimentales, nous faisons induire la synthèse de la membrane pourpre par les bactéries.

En premier lieu, on diminue l'agitation des fioles à culture de 180 à 90 r.p.m. afin de minimiser l'aération des ensemencements et par la suite la culture est exposée à un groupe de 8 tubes fluorescents (256 watts au total) pendant trois jours. Le milieu est agité légèrement pour garder les bactéries en suspension.

Trois jours plus tard, la membrane pourpre est présente en

quantité suffisante et on récolte les bactéries.

#### 2.1.6 Récolte des bactéries

Ce stade consiste à séparer les bactéries de leur milieu de croissance. La suspension bactérienne est donc centrifugée dans un appareil Sorvall RC-5B (10 000g pendant 10 minutes) à 4°C. Par la suite, les bactéries sont lavées deux fois dans une solution basale de sels pour enlever le milieu de culture restant. La solution basale de sels est composée des produits suivants:

|      |      |
|------|------|
| NaCl | 250g |
|------|------|

|     |    |
|-----|----|
| KCl | 2g |
|-----|----|

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O | 20g |
|---------------------------------------|-----|

pour un volume final de 1 litre de solution.

Le pH est ajusté à pH=7 avec du NaOH.

Leur poids frais est mesuré et elles sont alors déposées dans un bécher (600ml) où elles sont mises en présence de trois fois leur poids frais de solution basale de sels. On remet en suspension par une agitation mécanique puis 10mg d'ADNase (Sigma Chemicals Co, St-Louis) y sont rajoutés. L'agitation s'effectue pendant une heure à l'obscurité et on obtient un mélange pâteux. Cette suspension est alors dialysée pendant 16 heures à 4°C contre de l'eau distillée avec un changement d'eau après 1:30 heure. C'est à ce moment qu'a lieu la lyse des cellules résultant en des fragments de membranes de grandeurs variables.

### 2.1.7 Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes peuvent se conserver très longtemps si on repique les bactéries à partir des géloses déjà ensemencées. Ce repiquage permet aux bactéries de garder un milieu toujours frais et ayant tous les nutriments nécessaires à leur survie.

Pour fabriquer les géloses, 3g d'Oxoid peptone et 3g de Bacto Agar (Difco Laboratories, Détroit U.S.A.) sont dissous dans 200ml de milieu de culture (sans peptone). Cette solution est chauffée sous agitation mécanique continue jusqu'à ce qu'elle s'éclaircisse puis elle est stérilisée à l'autoclave. Elle est ensuite coulée dans des plats de Petri (environ 10 plats de Petri). Les milieux se gélifient et sont conservés dans un sac de plastique pour éviter qu'ils ne s'assèchent. Les géloses sont repiquées environ tous les trois mois et la croissance des bactéries s'effectue dans un incubateur (Fisher Scientific Co, modèle Isotemp) à 37°C durant 10 jours. Elles sont ensuite conservées à 4°C.

## 2.2 Préparation de la membrane pourpre

### 2.2.1 Séparation de la membrane pourpre des débris cellulaires

La membrane pourpre est préparée selon la méthode d'Oesterhelt et Stoeckenius (1971). Afin d'obtenir seulement la membrane pourpre libérée des constituants cellulaires, le dialysat obtenu en 2.1.6 est centrifugé à 10 000g pendant 20-25 minutes. Le culot contient des débris cellulaires tandis que le surnageant est constitué de la fraction membranaire des cellules. Ce surnageant est alors

centrifugé à 50 000g pendant 1:30 heure. A ce moment, le culot contient la membrane pourpre en majorité tandis que le surnageant est constitué de membranes rouges. Le culot (membrane pourpre) est resuspendu dans l'eau distillée et recentrifugé pendant 1:30 heure. Cette étape est répétée deux à trois fois jusqu'à ce que le surnageant soit presque incolore.

#### 2.2.2 Purification de la membrane pourpre

A la membrane pourpre obtenue en 2.2.1 est accolée une partie de membranes rouges contaminantes. Cette étape permettra une séparation de ces deux types de membranes. Le culot (membrane pourpre) est déposé sur un gradient discontinu de sucrose: 7ml (1,5 M) - 21ml (1,3 M). On procède ensuite à une ultracentrifugation de 48 heures dans le rotor SB-110 de l'appareil IEC (modèle B-60) à 260 000g. La membrane pourpre sera à l'interface 1,3 et 1,5 M tandis que la membrane rouge se retrouvera au-dessus de la portion contenant 1,3 M de sucrose. La bande pourpre est recueillie et dialysée contre de l'eau distillée pendant 16 heures avec un changement d'eau afin d'éliminer le sucrose. Le dialysat est centrifugé à 50 000g dans l'appareil Sorvall RC-5B pendant 1:30 heure. La membrane pourpre obtenue est alors resuspendue dans la solution basale de sels pour la conservation (0-2 ans). Le rendement en membrane pourpre est évalué d'après le spectre d'absorption en utilisant un coefficient d'extinction ( $\epsilon_{560nm}$ ) de 54 000  $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , tel que suggéré par Oesterhelt et StoECKENIUS (1971).

## 2.3 Purification de la bactériorhodopsine de la membrane pourpre

### 2.3.1 Délipidation de la bactériorhodopsine

La méthode de délipidation utilisée est celle décrite par Huang et coll. (1980). La MP (20 D.O.) est solubilisée dans 0,5cc d'une solution à 5% de Triton X-100 dans un tampon acétate 100mM (pH 5,0) et soumise à une agitation périodique pendant deux jours à 20°C par l'utilisation d'un Vortex. Toutes les opérations s'effectuent à l'obscurité. Le mélange est sédimenté à 50 000g pendant 1:30 heure et le surnageant est chargé sur une colonne de Biogel A-0,5 M (1,5 x 100 cm) prééquilibrée avec un tampon Tris-HCl 10mM, NaCl 150mM, acide déoxycholique 0,25% et  $\text{NaN}_3$  0,025% à pH 8,0 et à 4°C. L'élution s'effectue avec ce même tampon. Les fractions contenant la bactériorhodopsine sont recueillies et mesurées par spectroscopie d'absorption.

### 2.3.2 Echange de détergents

#### 2.3.2.1 Principe de la méthode

La méthode d'échange de détergents choisie est la chromatographie par interaction hydrophobe. Elle est basée sur le fait que les protéines possédant des résidus superficiels non-polaires s'adsorbent à des groupements non-polaires fixés à un ligand. La bR est une protéine très hydrophobe et s'adsorbe fortement à ce type de support.

### 2.3.2.2 Méthode expérimentale

Les échantillons de bR recueillis du tamis moléculaire en 2.3.1 sont ensuite chargés sur une colonne de Phényl Sépharose CL-4B (chromatographie par interaction hydrophobe) préalablement équilibrée avec le même tampon utilisé lors du tamis moléculaire. Le gel est lavé avec 10-20 fois le volume de la colonne de tampon phosphate 50mM (pH 7,0) et l'élution est amorcée par l'introduction d'un gradient de lauryl sucrose (0,2-0,5 %) dans le tampon phosphate. On procède ensuite à une ultrafiltration sur filtre PM 10 Amicon (Amicon Corp., Lexington, Massachusetts) des fractions de bR recueillies et mesurées spectralement afin de concentrer l'échantillon de protéine. L'évaluation du rendement se fait par la spectroscopie d'absorption.

### 2.3.3 Préparation de la bR délipidée exempte de détergents

Les échantillons de bR délipidée sur le tamis moléculaire en 2.3.1, adsorbés sur le gel de Phényl Sépharose et lavés avec le tampon phosphate (voir 2.3.2.2) peuvent également être élués à l'aide d'autres détergents. Cependant, il pourrait être avantageux de choisir un détergent possédant une concentration micellaire critique (CMC) suffisamment élevée pour permettre une dialyse ultérieure rapide de l'échantillon.

Nous avons donc effectué cette chromatographie en présence d'octyl glucoside suivie par une dialyse extensive contre de l'eau

ou du tampon. Le dialysat de bR délipidée maintenant exempt de détergent est ensuite centrifugé à 50 000g pendant deux heures à 4°C et elle se retrouve dans le culot.

## 2.4 Reconstitutions bR-détergents

Dans le but de connaître à quel degré les paramètres spectraux de la bactériorhodopsine pourraient être modulés par des interactions avec des molécules amphiphiles, nous avons dispersé le pigment purifié libéré des détergents dans différents milieux.

Ainsi la bactériorhodopsine délipidée et dialysée est remise en suspension dans quelques détergents dans lesquels elle est relativement stable, notamment le Triton X-100 et une série d'esters de sucrose comportant différentes longueurs de chaînes hydrophobes.

## 2.5 Techniques spectroscopiques

### 2.5.1 Absorption

Les spectres d'absorption ont été mesurés par l'utilisation d'un spectrophotomètre enregistreur UV-visible Pye Unicam SP 8-100 (Canlab, Montréal) muni d'un accessoire porte-échantillons pour échantillons turbides permettant d'enregistrer les spectres sans qu'ils ne soient faussés à cause de la lumière diffusée par l'échantillon. Ce spectrophotomètre a été modifié de telle sorte qu'on peut y adapter des accessoires servant à l'analyse des échantillons à basse température. Il est aussi muni d'une fenêtre latérale permettant d'éclairer l'échantillon.

### 2.5.2 Accessoires de basse température

La fenêtre latérale du spectrophotomètre d'absorption permet l'installation d'un filtre interférentiel (à 450 ou à 550nm) dépendant de l'intermédiaire de la bR qu'on désire exciter. Pour l'excitation, on utilise un projecteur à diapositives (Ditric Optics Inc. modèle 4400 JPJ C3) dont le faisceau est concentré le plus possible sur le filtre choisi.

Un cryostat (Oxford Instruments, Oxford, Angleterre) peut être installé au niveau du compartiment de l'échantillon du Pye-Unicam SP 8-100. Le cryostat se joint à une unité de contrôle de température et à un débitmètre contrôlant le pompage de l'azote liquide. L'échantillon est déposé dans le porte-échantillons lui-même inséré dans le cryostat. L'échantillon est aligné de manière à donner une absorbance minimale à 700nm et le zéro est ajusté par une suppression d'absorbance.

#### 2.5.2.1 Méthode expérimentale

Le cryostat est évacué par pompage quelques heures avant l'expérimentation pour permettre d'atteindre plus facilement de basses températures. L'échantillon de bR est en solution dans le glycérol (50-70%) pour obtenir la formation d'un verre transparent aux basses températures. Un spectre de l'échantillon à la température ambiante (298°K) est enregistré puis l'échantillon est refroidi jusqu'à la température désirée (298 à 77°K) par l'ouverture du débit d'azote. On enregistre de



nouveau un spectre à la température obtenue. Puis on procède à l'excitation de l'échantillon par illumination durant 10-15 minutes avec le filtre adéquat à l'analyse effectuée. Lors des excitations lumineuses, le spectrophotomètre est fermé. Après illumination, un spectre est mesuré afin d'observer les transitions s'étant effectuées. On peut ensuite réchauffer l'échantillon et l'analyser à une autre température si on le désire.

### 2.5.3 Raman de résonance

#### 2.5.3.1 Préparation des échantillons

Les culots de bR purifiée ont été suspendus dans 35 $\mu$ l de tampon phosphate 50mM (pH 7). La bR deutériée a été préparée par des centrifugations répétées de la bR dans 99,8% de D<sub>2</sub>O (Sigma). Les suspensions aqueuses de bR (35 $\mu$ l) ont été déposées dans une dépression concave sur une tige de cuivre reliée à un vase Dewar d'azote liquide et immédiatement refroidie. La température a été maintenue à 88°K et la diffusion Raman a été mesurée à angle droit du point d'incidence du rayon laser sur l'échantillon.

#### 2.5.3.2 Méthode expérimentale

L'échantillon de bR délipidée exempte de détergents a été excité à 476,5nm et la bR purifiée dans le lauryl sucrose à 514,5nm à l'aide d'un laser à l'argon ionisé (Spectra Physics, modèle 165). La puissance du laser était inférieure à 6 mW pour

éviter la photodégradation. Un monochromateur (Spex, modèle 1877) et un réseau de diodes refroidies (P.A.R., modèle 1420-2) avec un contrôleur à multicanaux (P.A.R., modèle 1218) ont été utilisés pour obtenir les spectres Raman. Ce système Raman à multicanaux est relié à un ordinateur (D.E.C., modèle LSI-11) et peut recevoir des données simultanément dans environ 700 points. Ceci permet une fenêtre de  $800\text{--}1800\text{cm}^{-1}$  de large à  $476,5\text{nm}$  d'excitation, dépendant du réseau utilisé. La résolution est ainsi de  $7\text{cm}^{-1}$ . L'échelle des longueurs d'onde a été calibrée contre des bandes Raman de toluène.

#### 2.5.4 Spectroscopie d'émission

Les spectres d'émission ont été mesurés avec un spectrofluorimètre Spex Fluorolog, modèle 111 (Spex Industries Inc., N.J.). Ce spectrofluorimètre est relié à un enregistreur X-Y (Houston Instrument) afin de permettre l'enregistrement des spectres d'émission ou d'excitation.

#### 2.5.5 Photolyse éclair

Dans les expériences de photolyse éclair, l'éclair actinique est obtenu par déclenchement d'un laser Neodymium/YAG (raie  $532\text{nm}$ , fréquence doublée; impulsion  $10\text{ns}$  "Q-switched"; énergie  $30\text{mW}$ /éclair) (Laser System 2000, JK Lasers, Rugby, Angleterre). Le faisceau de lumière actinique est diffusé par une paroi givrée (opal glass) avant d'atteindre un système porte-échantillon/échantillon thermostaté lequel est analysé à  $90^\circ$  du point d'incidence du

faisceau actinique avec une lumière monochromatique obtenue d'un système d'illumination composé d'une lampe au Xénon de 150 W et d'un monochromateur à réseau (Photon Technology Int., Princeton, N.J.). Un obturateur électronique synchronisé est situé entre ce système et le porte-échantillon. Il peut être ouvert pour une période de temps variant de 0,5 à 25 s, permettant suffisamment de temps pour l'analyse spectrale et évitant ainsi la surexposition de l'échantillon. A la sortie du porte-échantillon, le faisceau d'analyse entre dans un second monochromateur (Spex, 0,5m, 0,3nm/mm). Une photodiode et un amplificateur de courant (temps de montée: 50ns) sont reliés à la sortie du second monochromateur et le signal est acheminé à un oscilloscope digital (Nicolet 4094, Nicolet Instruments Corp., Mississauga, Ont.).

## 2.6 Effet du pH sur la bR délipidée

Cette expérience permet de connaître la stabilité, la résistance et la nature de la bR purifiée pour des valeurs de pH connues. Les échantillons de bR délipidée ou reconstituée dans les différents détergents sont soumis à une vaste gamme de pH et les spectres d'absorption sont mesurés pour chaque valeur de pH obtenue. Le pH est déterminé par l'utilisation d'un pH mètre (Corning modèle 10, Medfield, Massachusetts). L'étendue des mesures varie entre pH 1,5 et 12. Le pH est ajusté avec du NaOH ou du HCl ( $\sim 0,1$  N). A l'analyse spectrale, le ou les maximums d'absorption ainsi que les rapports entre ceux-ci sont calculés.

## 2.7 Effet de l'hydroxylamine et du borohydrure de sodium

### 2.7.1 Principe

Sous illumination, le chromophore de la bR contenue dans la MP réagit normalement avec l'hydroxylamine qui attaque le lien de BS entre le rétinol et la bactériopsine, convertissant le rétinol en rétinoloxime par la réaction du rétinol avec le résidu aminé de l'hydroxylamine. Le borohydrure de sodium agit également à la lumière sur la bR native en réduisant la double liaison de la base de Schiff formant ainsi une rétinilidyl opsine.

Ces deux produits réagissent normalement avec la MP seulement lorsqu'on illumine les échantillons de bR native: c'est seulement au cours des changements qui ont lieu lors du photocycle normal que le chromophore devient accessible à l'action de l'hydroxylamine et du borohydrure de sodium. L'effet de ces produits à l'obscurité sur la bR purifiée pourrait donc nous fournir des informations au niveau conformationnel, à savoir si la protéine conserve la même structure lorsqu'elle n'est plus en présence des lipides membranaires.

### 2.7.2 Méthode expérimentale

A la bR délipidée est ajoutée de l'hydroxylamine neutralisée (1 M) dans un excès molaire de 1 000 fois par rapport au pigment ou du borohydrure de sodium (3-4% p/v) et l'effet de ces produits sur la bR est mesuré par la spectroscopie d'absorption en comparant la bande à 480nm caractéristique de la bR délipidée avec la bande à 360nm caractéristique au rétinol libre. Toutes ces opérations sont

réalisées à l'obscurité.

## 2.8 Produits chimiques

Voici la liste des produits utilisés:

- Les produits chimiques usuels: Fisher Scientific Co. Montréal, grade Reagent.
- Le NaCl (gros sel crystal séché Windsor): Ritchie Feed and Seed Co. Ontario.
- L'ADNase (grade I): Sigma Chemical Co. St-Louis.
- Les esters d'acides gras et de sucrose: Ryoto Co. Ltd Tokyo.
- L'acide desoxycholique: Sigma Chemical Co. St-Louis.
- Le Phényl Sépharose CL-4B: Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suède.
- Le Biogel A-0,5 M (200-400 mesh): Biorad Laboratory Richmond, Californie.

## CHAPITRE III

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Préparation de la membrane pourpre

##### 3.1.1 Rendement de membranes pourpres

La culture des bactéries nécessite un environnement stable tenant compte des conditions physico-chimiques propres à la croissance de l'espèce bactérienne étudiée. L'uniformité des conditions de culture est primordiale à la synthèse de membranes pourpres et les conditions optimales de croissance sont réalisées puisque l'incubateur utilisé permet d'agiter et d'éclairer lesensemencements en milieu fermé tout en ayant une température contrôlée.

Le rendement de la culture est d'environ de 30-40mg de membranes pourpres par litre de milieu, ce qui est comparable à celui obtenu par d'autres chercheurs (20-50 mg litre<sup>-1</sup>) (Oesterhelt et Stoeckenius, 1971).

##### 3.1.2 Analyse spectrale de la membrane pourpre

La figure (11) montre le spectre d'absorption de la membrane pourpre. Ce spectre est caractérisé par une bande d'absorption centrée à 560nm (forme adaptée à l'obscurité) caractéristique du complexe rétinale-opsine, la bactériorhodopsine, en plus de la bande à 280nm spécifique aux acides aminés aromatiques. La pureté spectrale, c'est-à-dire le rapport des absorbances à 280 et 560nm

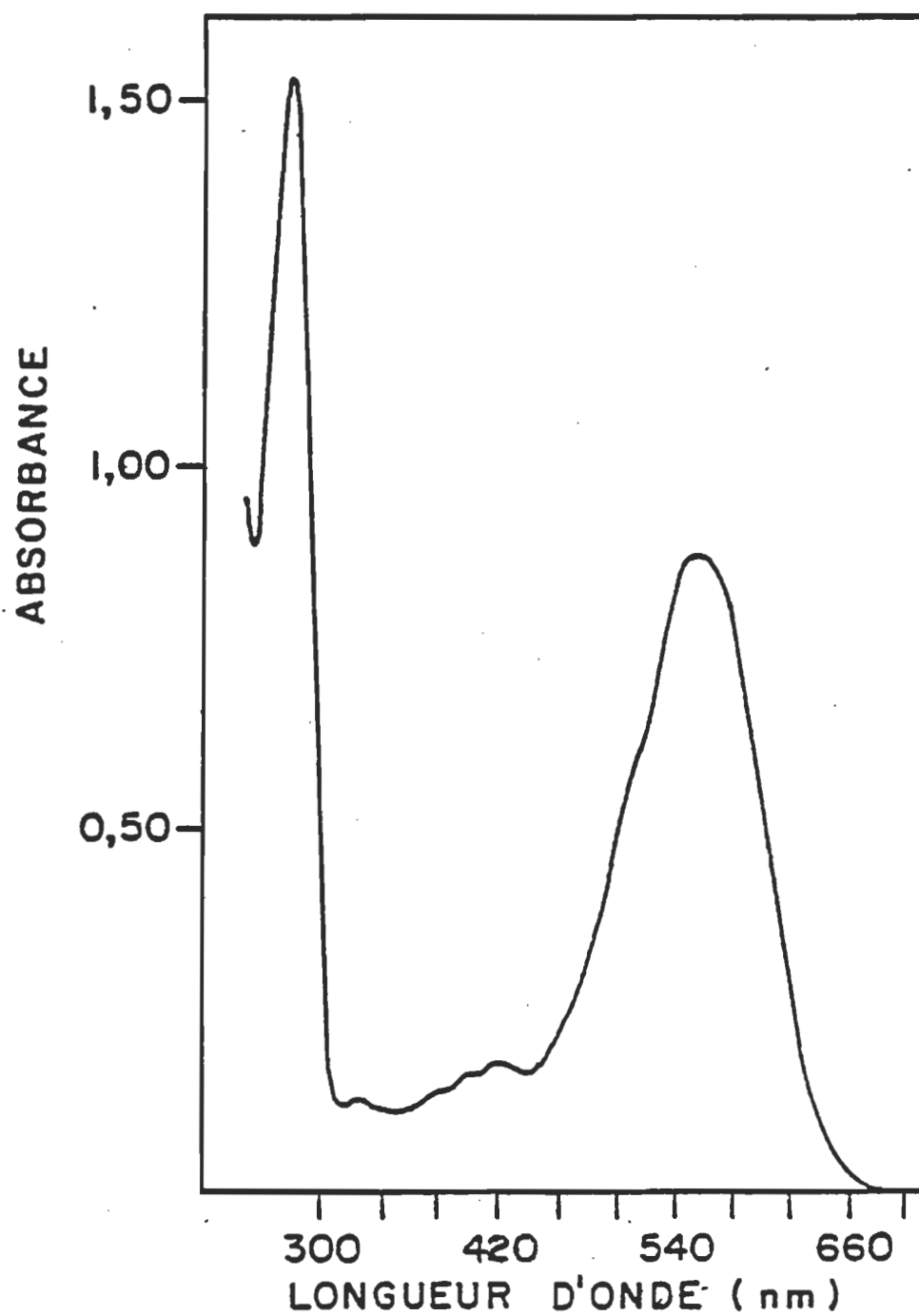


Figure 11: Spectre d'absorption de la membrane pourpre adaptée à l'obscurité,  $\lambda_{\text{max}}=560\text{nm}$ .

pour les échantillons obtenus est d'environ 1,7 par comparaison à des valeurs autour de 2,0 obtenues par Oesterhelt et Stoeckenius (1971).



### 3.2 Préparation de la bactériorhodopsine délipidée

#### 3.2.1 Délipidation de la bR dans le désoxycholate

Cette méthode de délipidation est une technique chromatographique permettant d'enlever 99% des lipides endogènes; ce qui a été vérifié par le radio-dosage des lipides (Huang et coll. 1980). La membrane pourpre est ainsi solubilisée dans le Triton X-100 puis déposée sur un gel d'agarose et la bactériorhodopsine est éluée avec un tampon Tris-désoxycholate.

##### 3.2.1.1 Rendement de bR délipidée dans le DOC

Après la solubilisation de la MP (20 D.O.) pendant deux jours à 20°C, la suspension est centrifugée afin de sédimenter la portion de bR dans les membranes qui ne s'est pas monomérisée par l'action du détergent. En effet, tandis que la bR agrégée sédimente facilement à 50 000g, une des caractéristiques de la bR solubilisée sous forme de monomères est qu'elle ne sédimente pas lorsqu'elle est soumise à une force de 200 000g pendant 45 minutes (Dencher et Heyn, 1982). Il est donc possible de séparer la bR monomérique de la bR trimérique par centrifugation.

Ainsi, des 20 D.O. de MP soumis à l'action du Triton X-100, environ 18 D.O. de bR sont monomérisés, desquels, après avoir traversé le tamis moléculaire, il ne reste qu'environ 15 D.O. de bR.

### 3.2.1.2 Analyse spectrale de la bR délipidée dans le DOC

Dans la MP native, la bR absorbe à 560nm. Suite à la délipidation dans le DOC, la bR purifiée montre un spectre d'absorption centré à 538nm, comme rapporté par Huang et coll. (1980). Le maximum d'absorption de la bR subit donc un déplacement hypsochrome de 22nm dans la forme délipidée dans le DOC (Huang et coll. 1980, Bayley et coll. 1982, Pabst et coll. 1984).

### 3.2.1.3 Discussion

Le choix du Triton X-100 pour effectuer la solubilisation est dû au fait que ce détergent possède la propriété de monomériser efficacement en un temps convenable la MP (Dencher et Heyn, 1982). C'est d'ailleurs le seul détergent utilisé, jusqu'à maintenant, qui réussit à délipider complètement la bR, ce qui laisse croire que les interactions lipides-protéines ne sont pas facilement détruites avec la plupart des détergents et que ces interactions sont essentielles au maintien de la structure native de la bR. L'échange de détergent pour le DOC s'explique par la stabilité relativement meilleure de la bR dans ce second détergent et surtout par le fait que le DOC change la composition lipidique tout en préservant la morphologie des feuillets de MP (Hwang et Stoeckenius 1977); les lipides de la membrane sont ainsi remplacés par du DOC. Le temps requis pour cette chromatographie est d'environ 10 heures

à 4°C.

Une méthode similaire de purification a été envisagée par Pabst et coll. (1984). Celle-ci emploie les mêmes détergents pour effectuer la solubilisation et la délipidation, cependant elle s'avère beaucoup plus rapide par l'utilisation de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sous des conditions d'élution qui préservent la conformation native de la protéine. L'échange de détergents par HPLC est ainsi complété après environ une heure et les fractions de protéines éluées ne montrent pas de dénaturation du chromophore. Cependant cette méthode possède le désavantage de restreindre la quantité de bR pouvant être délipidée. Le maximum d'absorption est toujours vers 538nm comme dans la méthode de Huang.

### 3.2.2 Echange de détergent

La bR est une protéine possédant un caractère particulièrement hydrophobe en raison de sa composition en acides aminés. Lorsque la bR délipidée dans le DOC est introduite sur un gel de Phényl Sépharose préalablement équilibrée avec du DOC, la bR s'adsorbe fortement au tiers supérieur du gel et lors de l'élution, la protéine se détache lentement, ce qui confirme qu'elle se lie réellement à ce type de support. Dépendant du profil du gradient de détergent utilisé, le volume d'élution peut varier énormément (70-400 ml).

Puisque nous désirons échanger de détergent, le gel est lavé

avec environ 20 fois le volume de la colonne de tampon phosphate (50mM, pH 7) puis la protéine est éluée dans le détergent de notre choix.

Lorsque la bR délipidée est éluée dans le lauryl sucrose, le maximum d'absorption ressemble à la superposition d'au moins deux bandes et selon l'acidification ou l'alcalinisation du milieu, le maximum d'absorption est centrée soit à 540, soit à 480nm respectivement (figure 12).

### 3.2.3 Préparation de la bR délipidée exempte de détergents

Afin d'établir la dépendance environnementale de l'équilibre acido-basique entre les deux formes spectrales du pigment retrouvées dans le lauryl sucrose, nous pouvons choisir un autre détergent pour éluer la bR de la colonne de phényl Sépharose comme cité plus haut. Cependant, il s'est avéré plus rapide d'effectuer cette élution en présence d'octyl glucoside, un détergent possédant la propriété de se dialyser facilement, et d'éliminer ce dernier par une dialyse extensive de la protéine contre de l'eau ou du tampon.

#### 3.2.3.1 Analyse spectrale de la bR délipidée exempte de détergents

Lorsque la bactériorhodopsine est éluée dans l'octyl glucoside, son maximum d'absorption est toujours vers 540nm. Par contre suite à la dialyse du détergent, les caractéristiques d'absorption de la bR sont perturbées. La figure (13) nous montre le spectre d'absorption de la bR

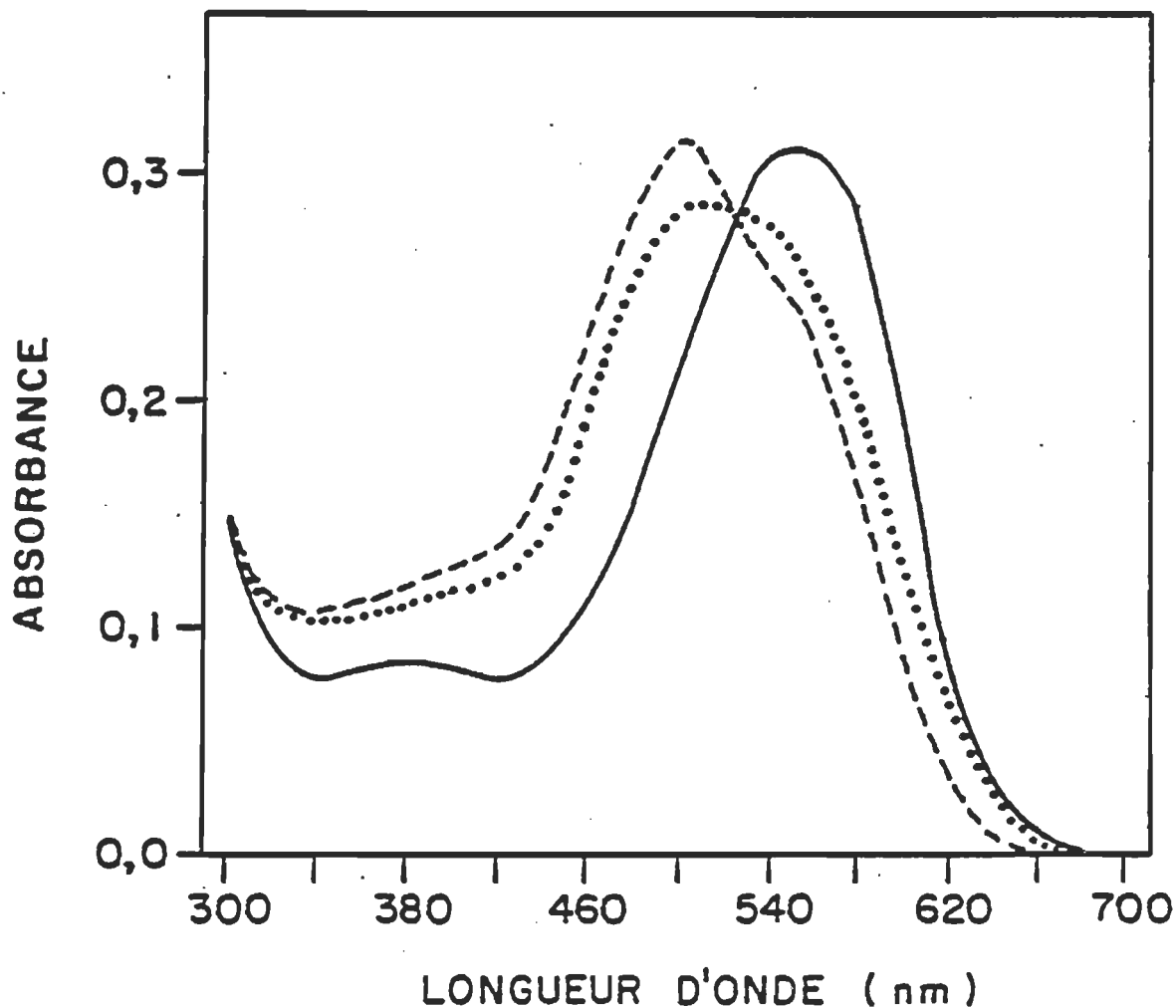


Figure 12: Effet du pH sur le spectre de la bactériorhodopsine purifiée dans le lauryl sucrose.

Les spectres ont été enregistrés à 22°C et la bactériorhodopsine est contenue dans une solution à 0,2% (p/v) de lauryl sucrose (...) dans un tampon phosphate 50mM (pH=7,0); après alcalinisation à pH=8,0 par addition d'une petite quantité de NaOH 0,1 N (---) et après acidification à pH=6,0 par l'addition de HCl 0,1 N (—).

délipidée suite à la dialyse de l'octyl glucoside. Ce spectre montre une bande d'absorption centrée à 480nm accompagnée d'un léger épaulement vers 540nm.

### 3.2.3.2 Discussion

En présence d'octyl glucoside, la bR est moins stable que dans les esters de sucrose, dans le Triton X-100 et dans le DOC, cependant la procédure est suffisamment rapide pour éviter une dénaturation significative du pigment. De plus, la dialyse (30ml d'échantillon/ 2 litres d'eau durant 36 heures avec 2 changements d'eau) nous donne l'avantage de pouvoir concentrer (sédimenter) les échantillons de bR maintenant dépourvue de lipides et de détergents, et qui peuvent par la suite être ré-associés avec les molécules amphiphiles désirées, facilement et rapidement. Il est à noter qu'à notre connaissance, c'est la première fois qu'on réussit à préparer des échantillons de bactériorhodopsine purifiée, sans détergent et sans lipides, qu'on peut facilement concentrer par sédimentation et conserver sur une période de temps considérable.

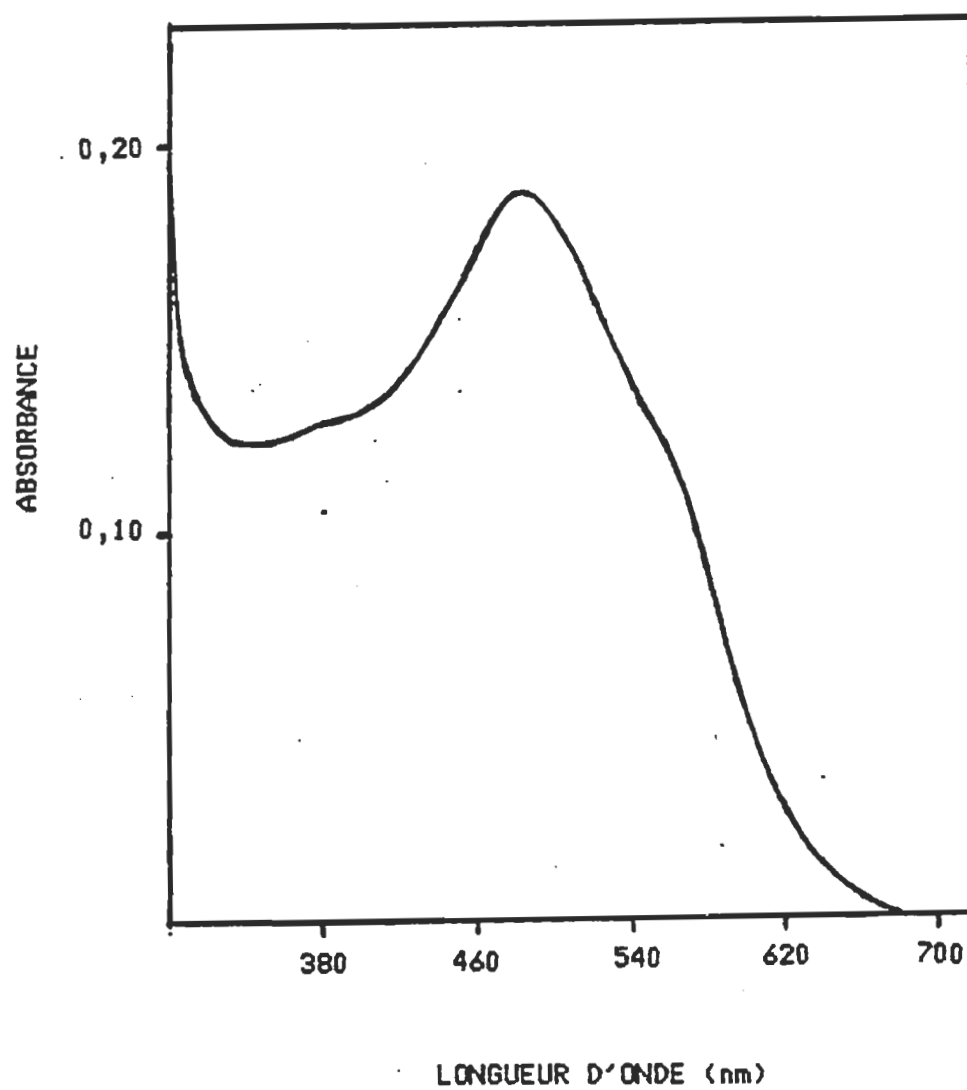


Figure 13: Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine délipidée suite à la dialyse de l'octyl glucoside,  $\lambda_{\text{max}}=480\text{nm}$ .

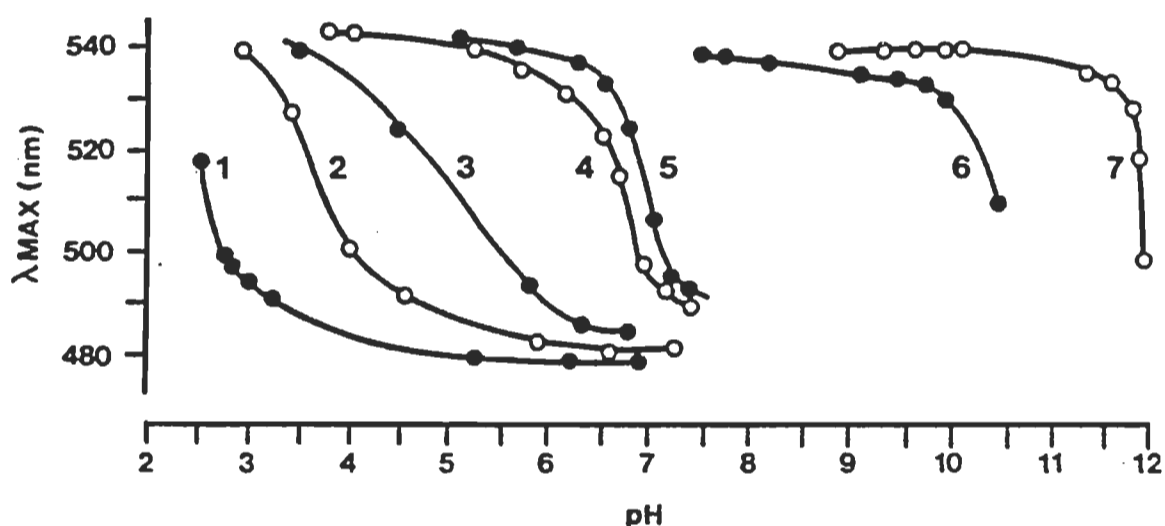
### 3.3 Reconstitutions bR-détergents

Dans le but de déterminer l'effet de l'environnement hydrophobe sur la réaction de protonation-déprotonation ( $bR540 \rightleftharpoons bR480$ ), nous avons préparé des reconstitutions de bR délipidée sans détergents avec une série de molécules amphiphiles de compositions définies. Nous avons ainsi dispersé le pigment purifié dans quelques détergents dans lesquels il est stable, notamment le Triton X-100 et une série d'esters de sucrose comportant différentes longueurs de chaînes hydrophobes, afin de voir la stabilité du pigment en fonction de la longueur et de la composition chimique des chaînes hydrophobes et déterminer quel est le milieu qui offre une meilleure corrélation avec les valeurs spectrales de la MP. Simultanément, nous avons effectué une étude comparative du maximum d'absorption dans ces différents détergents et nous avons mesuré l'effet du pH en fonction des différentes compositions chimiques des constituants utilisés dans les reconstitutions. Les courbes de titrations ont par la suite été établies et nous avons comparé les valeurs de pKa obtenues pour la bR dispersée dans ces différents milieux.

#### 3.3.1 Résultats

Les courbes de titration de la bR purifiée dispersée dans les différents milieux sont données dans la figure (14). La courbe (1) correspond à la bR agrégée dans l'eau. Ce pigment a un maximum d'absorption à 480nm dans l'étendue de pH de légèrement acide à très alcalin. A des valeurs de pH inférieure à 3,5, son  $\lambda_{max}$  se déplace graduellement vers les plus hautes longueurs d'onde jusque vers





**Figure 14:** Courbes de titration de l'équilibre acido-basique observé entre les chromophores absorbant à 540nm et à 480nm de la bactériorhodopsine purifiée lorsqu'elle est dispersée préalablement dans différents milieux.

La courbe (1) correspond à la titration de la bR agrégée sans détergent. Les courbes (2-6) ont été obtenues après solubilisation des agrégats de bR délipidée dans 0,4% (p/v) d'octyl sucrose (2), d'oleyl sucrose (3), de lauryl sucrose (4), de stéaryl sucrose (5) et de Triton X-100 (6). La courbe (7) a été obtenue lorsque les membranes pourpres ont été solubilisées dans 2% (p/v) de Triton X-100 ou de lauryl sucrose.

520nm à pH 2,5. Si on abaisse davantage le pH, ceci résulte en la dénaturation du pigment et on voit l'apparition de la bande d'absorption caractéristique au rétinol vers 367nm.

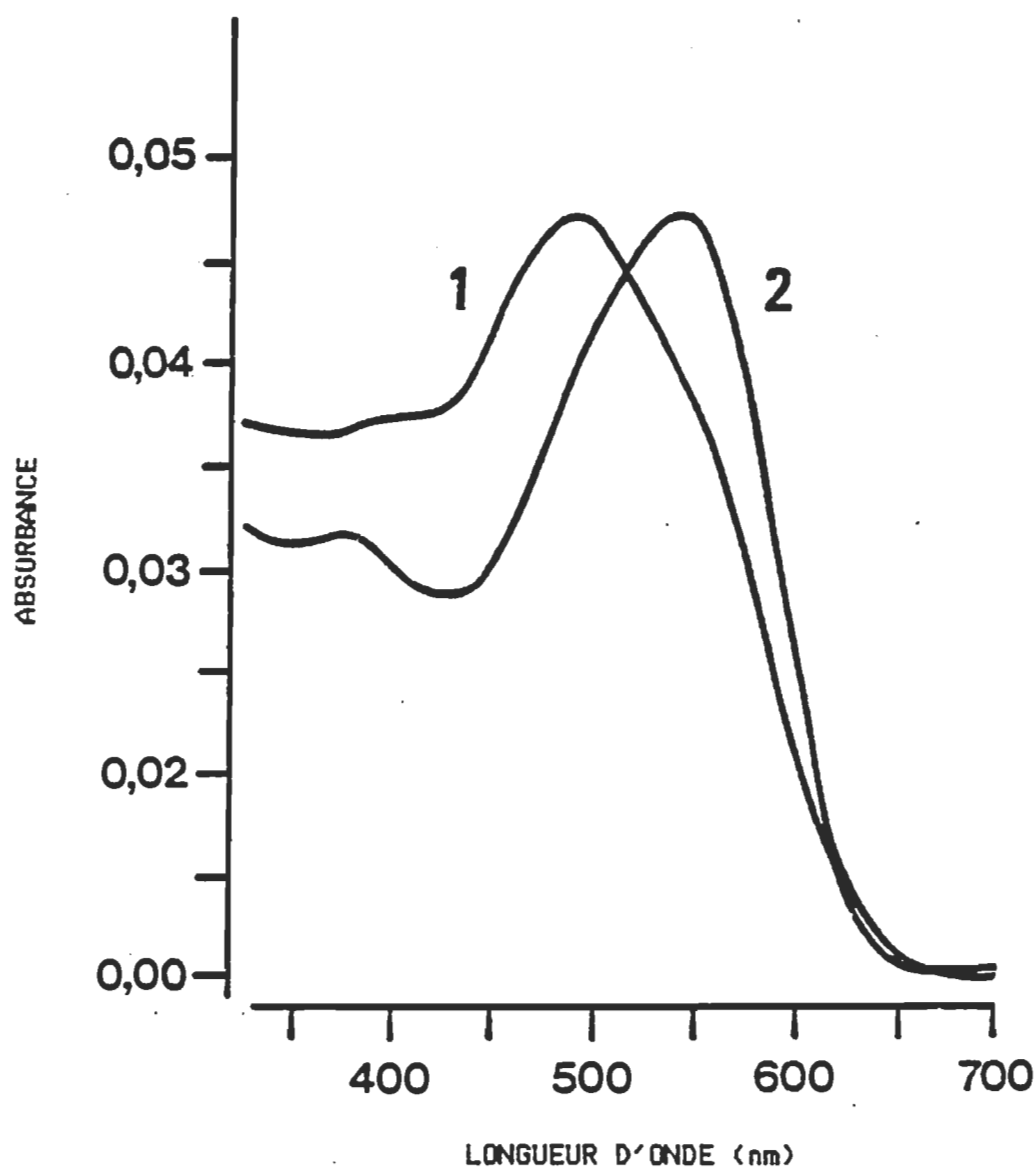
La dispersion de ces agrégats de bR dans les détergents déplace la courbe de titration vers des valeurs de pH plus élevées. Dans l'ester d'octyl sucrose (courbe 2), le point milieu de la titration est à pH 3,5. Il augmente davantage jusqu'à pH 6,8 et 7 dans les esters de lauryl et de stéaryl sucrose respectivement (courbe 4 et 5). Les esters de myristyl et palmityl sucrose donnent des courbes qui se situent entre les courbes (4) et (5). Il est intéressant de noter que l'introduction d'une double liaison dans la chaîne hydrophobe du détergent ramène la courbe de titration à des valeurs plus basses de pH, comme démontré par la courbe (3), laquelle a été obtenue dans l'ester d'oleyl sucrose (C18:1). Il faut toutefois souligner que les pK de ces courbes de titration dans les différents détergents dépendent légèrement de la concentration du détergent utilisée pour effectuer la dispersion de la bR agrégée. Les courbes de titration (1-6) présentées à la figure (14) ont été mesurées à des concentrations de détergents de 0,4% (p/v).

Lorsque la bR est dispersée dans le Triton X-100, le pigment montre une courbe de titration dans l'étendue de pH alcalin avec un pKa à environ pH 10,5 (courbe 6). Lorsque les membranes pourpres sont seulement solubilisées dans le Triton X-100 ou dans le lauryl sucrose (2% p/v), l'équilibre des chromophores absorbant à 480 et 540 nm a un point milieu de titration à pH 12 (courbe 7).

### 3.3.2 Discussion

Sauf pour ceux qui ont été dispersés dans l'ester d'octyl sucrose, tous les échantillons de bactériorhodopsine purifiée sont demeurés stables pendant plusieurs semaines à 4°C et leur titration peut être répétée aller-retour plusieurs fois, à condition que les conditions extrêmes de pH soient évitées. De plus, ils peuvent être réversiblement déplacés d'une courbe de titration à une autre simplement en changeant le milieu utilisé pour effectuer la dispersion de la bR agrégée. Par exemple, à pH 7, la solubilisation du pigment libéré des détergents dans le Triton X-100 déplace immédiatement son maximum d'absorbance de 480nm à 540nm (voir figure 15), tandis que la solubilisation avec l'octyl sucrose (0,4%) ou l'octyl glucoside (25mM) n'a pas d'effet sur le  $\lambda_{\text{max}}$  du pigment.

Des formes spectrales déplacées vers le bleu de la bactériorhodopsine peuvent être obtenues sous des conditions variées. Notamment, sous des conditions modérément alcalines, le maximum d'absorption de la bactériorhodopsine se situe entre 460 et 500nm dans les membranes pourpres auxquelles on a ajouté du diméthyl sulfoxide (DMSO) (Oesterhelt et coll., 1973; Pande et coll., 1986) ou du diethyl ether (Schreckenback et coll., 1977), dans les membranes pourpres immobilisées dans le polyacrylamide (Fischer et Oesterhelt, 1979) et dans les reconstitutions de bactériorhodopsine avec des lécithines (Lozier et coll., 1976). A pH neutre, des chromophores ayant des maxima d'absorption comparables sont formés par l'incorporation d'anesthésiques volatils dans la membrane



**Figure 15:** Effet du milieu utilisé pour disperser les agrégats de bR délipidée sur son maximum d'absorption.

La courbe (1) montre le spectre d'absorption des agrégats de bR purifiée en absence de détergent ( $\lambda_{\text{max}}=480\text{nm}$ , pH 5,6). Après l'addition de 0,2% (p/v) de Triton X-100 (courbe 2), les agrégats sont solubilisés; ils diffusent moins la lumière, comme on peut le constater par la diminution de l'absorbance dans la région entre 350 et 450nm et le maximum d'absorption est simultanément déplacé à 540nm.

pourpre (Nishimura et coll., 1985) ou en solubilisant et refroidissant les échantillons à  $-30^{\circ}\text{C}$  dans le Triton X-100 (Iwasa et coll., 1985). Toutes ces conditions expérimentales correspondent à des perturbations avancées de l'organisation membranaire et déstabilisent la structure native de la bactériorhodopsine, donnant lieu à la transition de pourpre à rouge. Lorsque les MP sont traitées avec du DMSO, le pK de l'équilibre entre les deux formes spectrales dépend alors de la concentration de DMSO utilisée et cet équilibre est influencé par le pH du milieu, ce qui comporte une certaine analogie avec la bR délipidée dont l'équilibre est déplacé vers l'une ou l'autre forme spectrale dépendant du pH, de la longueur de la chaîne hydrophobe et de la concentration du détergent utilisé pour disperser la protéine agrégée. Les résultats présentés montrent qu'à l'état purifié, la bactériorhodopsine adopte spontanément la forme spectrale absorbant à 480nm. En absence de lipides et de détergents, le pigment a un maximum d'absorbance à 480nm à des valeurs de pH plus hautes que 3,5. L'association de ce pigment avec les détergents régénère le pigment original à 540nm et sa stabilité lors de l'alcalinisation augmente lorsque la chaîne hydrophobe du détergent devient plus longue, le pigment pourpre délipidé le plus stable étant obtenu dans le Triton X-100.

Dans la bactériorhodopsine libre de lipides et de détergents, le pKa apparent du groupement qui contrôle l'équilibre acido-basique est environ 2,5. Ceci pourrait être la valeur du pKa du groupement lorsqu'il est librement accessible à partir de la phase aqueuse. Lorsque le pigment est associé avec des détergents ayant des chaînes

hydrophobes de plus en plus longues, le groupement titrable pourrait progressivement devenir de moins en moins accessible à la titration et, de ce fait, son pKa apparent augmenterait considérablement.

Dans la membrane pourpre, le site de la titration est probablement très isolé de la phase aqueuse de telle sorte que l'équilibre acido-basique n'est pas facilement observé. Cependant, il semble que non seulement la structure membranaire, mais aussi les interactions lipides-protéines contribuent à la stabilisation du chromophore natif. En fait, dans les membranes pourpres solubilisées (voir courbe 7 de la figure 14), la bactériorhodopsine monomérique (Dencher et Heyn, 1978; Naito et coll., 1981) n'est pas séparée des lipides, et sous ces conditions, le pigment absorbant à 480nm apparaît seulement à pH plus haut que 11,5. Nous proposons donc que les interactions de la bactériorhodopsine avec les composants lipidiques membranaires peuvent être, du moins partiellement, responsables du maintien de la couleur pourpre du pigment.

La valeur du pKa pourrait ainsi refléter la force des interactions de la bR avec les molécules amphiphiles de telle sorte que dans certains environnements lipidiques, les interactions lipides-protéines pourraient prévenir la formation de l'espèce bR480 comme il semble être le cas dans la MP native.

Les changements spectraux observés lors de la délipidation de la bactériorhodopsine pourraient être le résultat de la destruction d'interactions spécifiques existant dans la membrane pourpre native entre la protéine et les lipides dans lesquels elle est encastree.

Une étude ultérieure sur les interactions lipides-protéines dans des reconstitutions de bR480 avec différents lipides, en particulier les lipides endogènes pourrait sans doute éclaircir la signification physiologique de l'absence d'autres unités hydrocarbonnées dans les lipides de ces membranes bactériennes. En d'autres mots, il serait possible que la fonction de la bR soit dépendante de la présence de chaînes lipidiques branchées.

### 3.4 Spectroscopie Raman de résonance

Lorsque la bR est délipidée, il y a formation d'un équilibre entre deux formes spectrales:  $\text{bR480} \xrightleftharpoons[\text{OH}^-]{\text{H}^+} \text{bR540}$ , et la nature du site de la titration est pour le moment inconnue. Cependant, un équilibre semblable existe dans la membrane pourpre native (Druckmann et al, 1982), ayant dans ce cas-ci un pKa de 13,5, entre la forme bR560 et une espèce bR460, désignée d'après le maximum du spectre de différence observé lors de la titration et l'espèce bR460 a été alors identifiée à la forme déprotonée de la liaison aldimine qui relie le rétinale à la bactériopsine (bO). Dans le but de connaître si le site de la réaction dans la bR purifiée est aussi le lien de base de Schiff (BS), une étude de bR480 par spectroscopie Raman de résonance (RR) a été effectuée. Cette méthode pouvait éventuellement nous informer sur le rôle que jouent les lipides dans le contrôle du maximum d'absorption de la bactériorhodopsine.

Un des avantages de la diffusion RR, vu la forte augmentation d'intensité, est de pouvoir obtenir des spectres à partir de très faibles concentrations d'échantillons ou d'utiliser une puissance plus faible du laser ce qui est important lorsqu'on travaille avec des pigments photosensibles. De plus l'effet de résonance permet d'étudier une partie particulière d'une macromolécule puisque la diffusion de celle-ci peut être sélectivement augmentée en utilisant une longueur d'onde d'excitation où seulement cette partie absorbe.



La spectroscopie de RR pourra donc nous informer sur les interactions moléculaires et la structure à l'état fondamental du chromophore, lesquelles sont responsables des propriétés spectroscopiques qui sont observées dans la bactériorhodopsine.

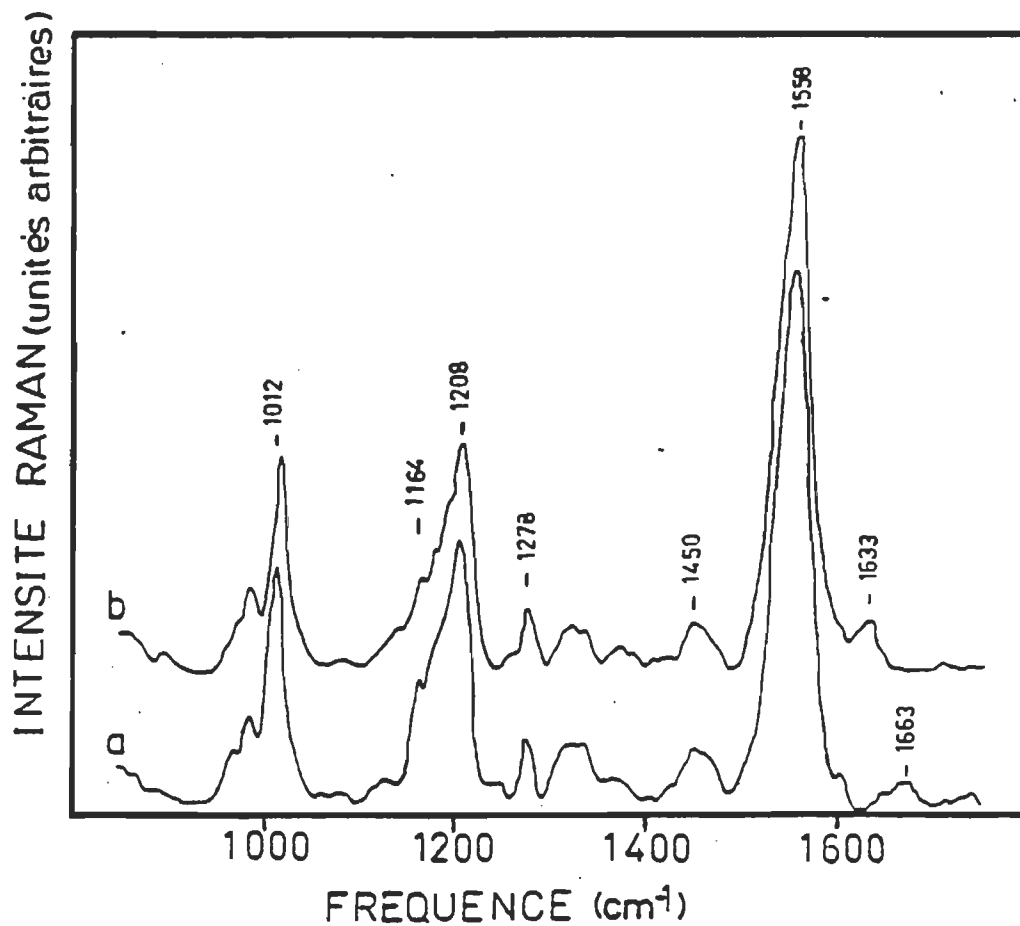
### 3.4.1 Région C=C

#### 3.4.1.1 Résultats

Les figures (16) et (17) nous montrent les spectres de résonance Raman des échantillons de bR agrégée dans l'eau (bR480) et de bR délipidée dispersée dans le lauryl sucrose respectivement. Lorsque la bR délipidée est dispersée dans le lauryl sucrose (LS) à pH neutre, il s'établit un équilibre entre deux formes spectrales bR480 et bR540 (bRI480/540 ILS). Dans la région entre  $1500$  et  $1600\text{cm}^{-1}$ , nous apercevons une bande intense positionnée à  $1558\text{cm}^{-1}$  dans le cas de bR480 et deux bandes intenses à  $1533$  et  $1552\text{cm}^{-1}$  pour l'échantillon de bRI480/540 ILS.

#### 3.4.1.2 Discussion

La bande à  $1533\text{cm}^{-1}$  correspond à un pigment dont la longueur d'onde maximale d'absorption est de  $540\text{nm}$  tandis que la bande à  $1552\text{cm}^{-1}$  s'identifie à un pigment ayant un maximum d'absorption à  $480\text{nm}$ . Des bandes comparables apparaissent dans les spectres des différents intermédiaires de la bR dont bR570 à  $1529\text{cm}^{-1}$  (figure 18), bR603 (3-déhydrorétinal) à  $1509\text{cm}^{-1}$  (Massig et coll., 1982) et aussi des chromophores modèles

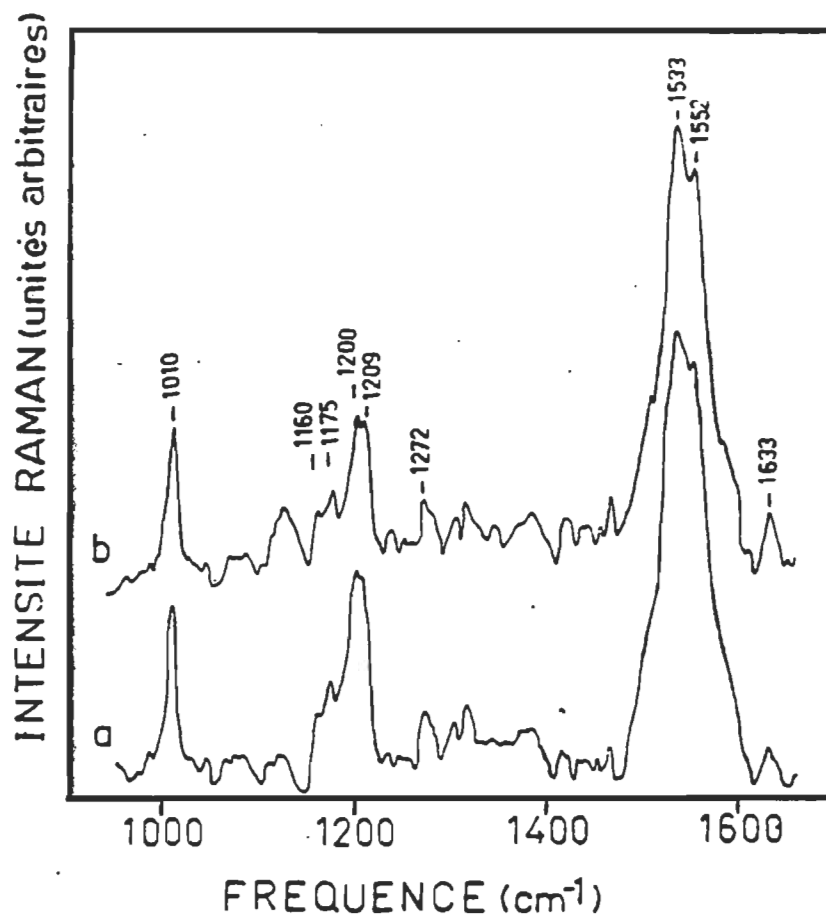


**Figure 16:** Spectres Raman de résonance de la bactériorhodopsine délipidée (bR480).

(a): bR480 dans  $\text{H}_2\text{O}$

(b): bR480 dans  $\text{D}_2\text{O}$

L'excitation s'est effectuée à 476,5nm.



**Figure 17:** Spectres Raman de résonance de la bactériorhodopsine délipidée dispersée dans 0,4% (p/v) de lauryl sucrose (bR480/540)LS.

(a): pH=6 (tampon phosphate, 50mM)

(b): pH=8 (tampon phosphate, 50mM)

L'excitation s'est effectuée à 514nm.

protonés en solution ( $\lambda_{\text{max}}=440\text{nm}$ ) à  $1557\text{cm}^{-1}$  (figure 19) (Pande et coll., 1981). Cette bande est la plus intense des spectres de RR des pigments contenant un rétinal et elle correspond aux mouvements d'élongation C=C. Nous remarquons que la fréquence de ce mode est inversement proportionnelle au maximum d'absorption de la transition électronique ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) des chromophores (Heyde et coll., 1971), lequel dépend essentiellement du degré de délocalisation des électrons  $\pi$  dans le polyène (Honig et coll., 1976). La fréquence du mode C=C dépendra donc essentiellement de la densité des électrons dans les liaisons C=C. L'augmentation de la délocalisation des électrons résulte en une diminution de la densité électronique dans les doubles liaisons et une augmentation dans les liens simples essentiels. Ainsi, la position de la bande correspondant au mode d'élongation éthylénique (C=C) est une indication sensible de la délocalisation des électrons puisqu'avec une augmentation de la délocalisation, l'ordre de la liaison est diminuée ce qui résulte en un déplacement vers les plus basses fréquences de la bande C=C (Aton et coll., 1977).

Les modèles de charges ponctuelles externes expliquent les interactions entre le chromophore (rétinal) et la protéine (opsine) qui déterminent la longueur d'onde maximale des pigments formés: entre autres la bR ou la rhodopsine visuelle (Nakanishi et coll., 1980). Dans le cas de la bR (figure 10, introduction), le modèle implique une paire de

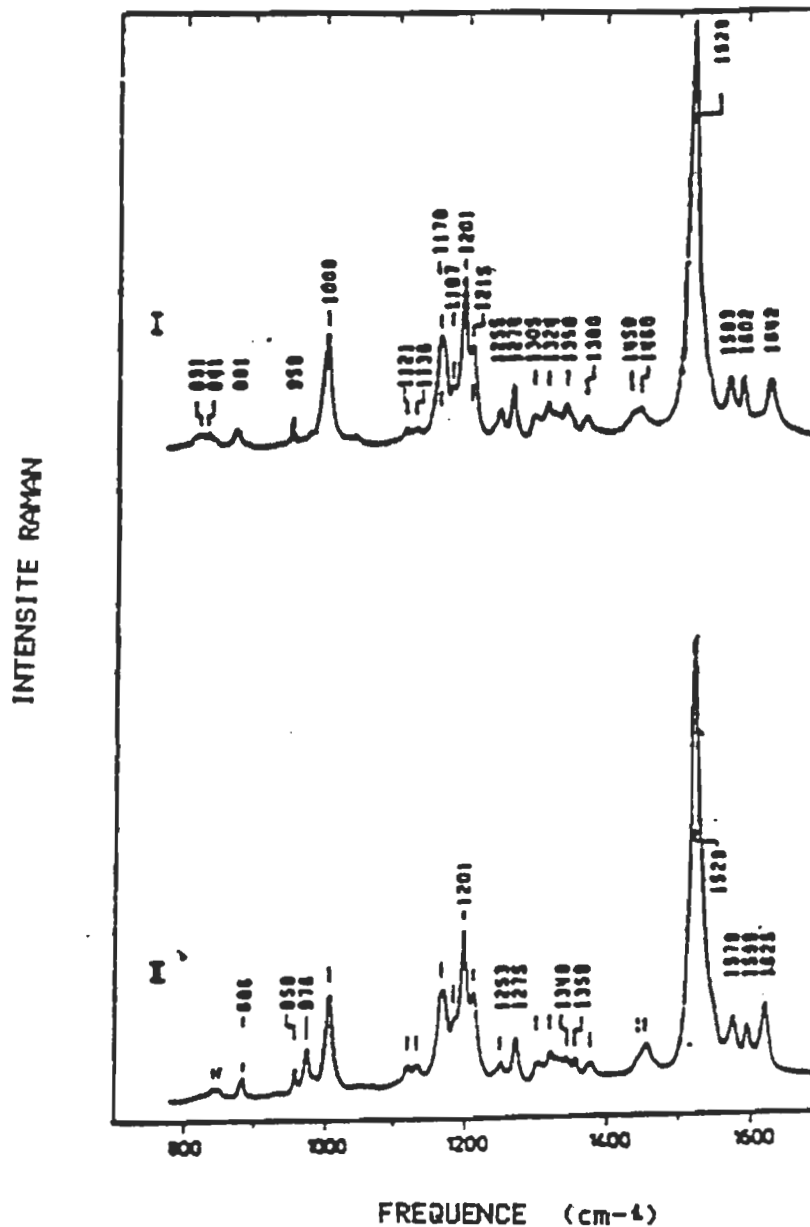
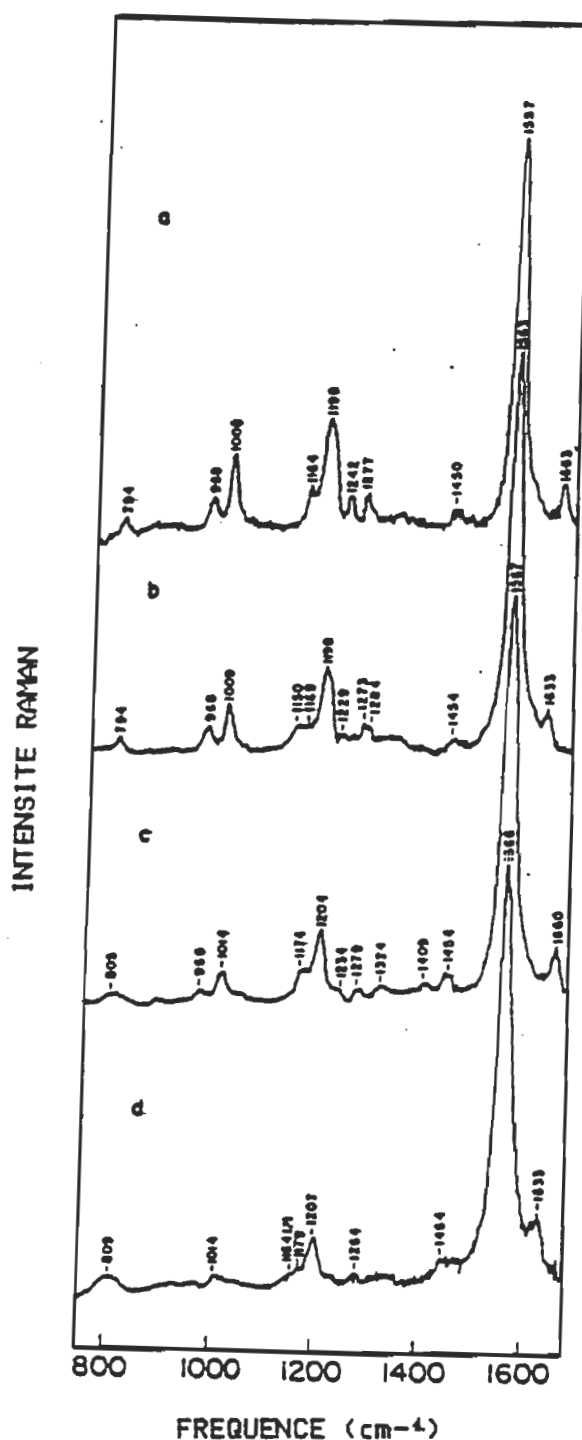


Figure 18: Spectres Raman de résonance de la bactériorhodopsine native (bR570) à partir d'une suspension aqueuse de membranes pourpres. L'excitation s'est effectuée à 514nm.

(I): bR570 dans  $H_2O$

(II): bR570 dans  $D_2O$

Massig et coll. (1982)



**Figure 19:** Spectres Raman de résonance de chromophores modèles ayant des bases de Schiff protonées.

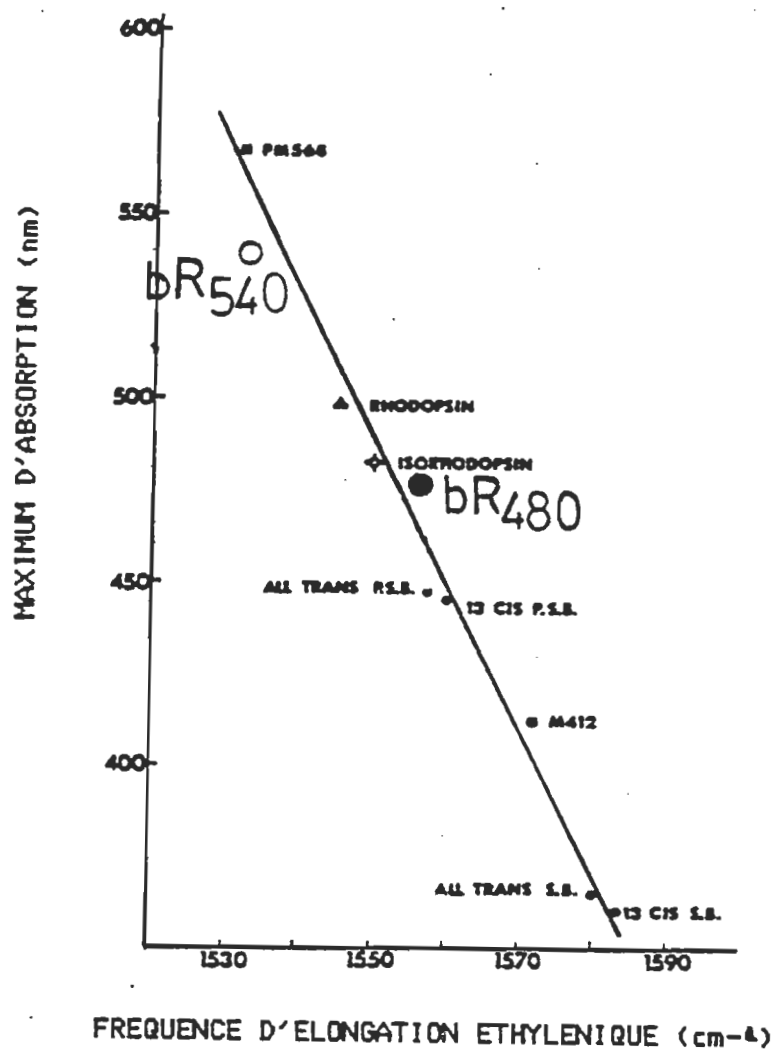
(a et c): Bases de Schiff protonées de tout-trans et 13-cis rétinol, respectivement, dans l'éthanol.

(b et d): Bases de Schiff deutériées de tout-trans et 13-cis rétinol, respectivement, dans le  $[^2\text{H}]$  méthanol ( $\text{CH}_3\text{O}^2\text{H}$ ).

L'excitation s'est effectuée à 476,2nm et la résolution est de  $8\text{cm}^{-1}$ . Pande et coll. (1981).

charges (provenant de la protéine: bactériopsine) en contact avec l'anneau ionone à  $3,5\text{\AA}$  du  $C_5$  et près de  $C_7$  et une autre charge négative cette fois près de l'azote du lien de base de Schiff (BS) formé entre le résidu lysine de la bactériopsine et le groupement aldéhyde du rétinol. L'effet de délocalisation est, comme prévu, plus fort pour les BS protonées. Les charges externes augmentent considérablement la délocalisation et son effet se fait sentir dans toute la chaîne où toutes les liaisons semblent subir des changements de géométrie comparables lors de l'excitation de la bR tandis que dans la rhodopsine (où la charge externe est située à  $3\text{\AA}$  du  $C_{12}$ ), le lien  $C_{11}-C_{12}$  subit le plus grand changement (Kakitani et coll., 1983). Le diagramme de corrélation (figure 20) (Aton et coll., 1977; Smith et coll., 1984) suggère donc que les différences entre une BS protonée en solution et la bR native (bR570) résultent d'une augmentation de la délocalisation du système d'électrons  $\pi$  conjugués lors de la liaison du rétinol à la protéine.

Comparons maintenant les fréquences du mode C=C pour bR480 et bRI480/540ILS par rapport à celles de bR570 et des chromophores modèles. Sachant que bR480 est délipoïdée et que sa fréquence est augmentée par rapport à celle du pigment bR570 contenue dans sa membrane lipidique native, nous pouvons assumer que, lors de la délipoïdation, il se produit un changement, c'est-à-dire une diminution dans les interactions entre l'opsine et le rétinol et que, par conséquent, les



**Figure 20:** Diagramme de corrélation entre les fréquences d'élongation éthyléniques (C=C) des pigments à base de rétinal avec leur maximum d'absorption. (P.S.B.= base de Schiff protonée). Aton et al. (1977).

● bR480

○ bR540



électrons deviennent plus localisés dans les liens  $C=C$ . Cette affirmation est soutenue par le fait que la fréquence du mode  $C=C$  dans bR480 est approximativement la même que celle des chromophores modèles en solution, lesquels n'ont pas d'interactions électrostatiques (provenant de l'opsine) au niveau de l'anneau ionone du rétinol. Par contre lorsque le lauryl sucrose est ajouté à la bR délipidée (bRI480/540ILS), il semble que le détergent mime l'environnement lipidique; la fréquence d'élongation  $C=C$  diminue et sa valeur se rapproche de celle de bR570, ainsi dans ces conditions, il semble que l'on retrouve les interactions natives rétinol-bactériopsine.

### 3.4.2 Région $C=N$

#### 3.4.2.1 Résultats

Les bandes spectrales entre  $1600$  et  $1670\text{cm}^{-1}$  sont attribuées à des mouvements d'élongations provenant du groupement terminal du rétinol. Dans le spectre de bR480 (figure 16), une bande faible apparaît à  $1663\text{cm}^{-1}$  et est attribuée aux mouvements d'élongations  $C=N$ . Si on procède à la deutériation de l'échantillon, par la substitution isotopique du proton de l'azote, la bande  $C=N$  se déplace d'environ  $30\text{cm}^{-1}$  vers les plus basses fréquences pour se positionner à  $1633\text{cm}^{-1}$ .

### 3.4.2.2 Discussion

Ce mode d'élongation C=N a été très utilisé afin d'identifier l'état de protonation de la base de Schiff (Oseroff et Callender, 1974). Il a été démontré que lorsqu'on suspend des membranes pourpres (bR570) dans le D<sub>2</sub>O, le proton de la base de Schiff est échangé pour un deutéron, causant un déplacement caractéristique de la fréquence de la vibration d'élongation C=N-H de la BS (Lewis et coll., 1974). Ce déplacement est d'environ 17cm<sup>-1</sup> pour la bR (ses intermédiaires et ses analogues aussi) dans le D<sub>2</sub>O et ceci est accepté comme évidence spectroscopique de la protonation de la BS des chromophores de bR. Nous pouvons donc affirmer que dans la bR480, la BS est protonée. Les spectres obtenus de la bRI480/540ILS (figure 17) montrent aussi une bande faible mais à 1633cm<sup>-1</sup>. Cette bande est caractéristique d'une BS protonée d'un pigment absorbant à 540nm ou ayant une fréquence d'élongation C=C à 1533cm<sup>-1</sup>.

Nous avons vu qu'il existe une relation entre la longueur d'onde maximale d'absorption d'un pigment et sa fréquence d'élongation C=C. Cependant, il n'existe pas de relation similaire entre la fréquence d'élongation C=N et le maximum d'absorption pour les bases de Schiff protonées. Puisque le lien C=N dans les BS protonées est aussi conjugué avec la chaîne du polyène, l'absence de cette corrélation est intrigante (Marcus et Lewis, 1978; Kakitani et coll., 1983).

Des considérations simples basées sur la délocalisation des électrons prédiraient que ces deux fréquences d'élongation seraient inversement corrélées avec le maximum d'absorption, lequel en général augmente avec l'augmentation de la délocalisation. De plus, il est surprenant que l'élongation C=N protonée (C=N+H) ait une fréquence plus élevée que l'élongation C=N non-protonée (C=N), en dépit du fait que dans le premier cas, on ait une masse effective plus grande et un plus petit ordre de liaison (Aton et coll., 1980; Kakitani et coll., 1983). Cette absence de corrélation semble être causée par le couplage avec le pliement (bending) C=N-H qui apporterait une contribution importante à l'élongation C=N dans les bases de Schiff protonées et déplacerait ainsi ce mode de vibration vers des plus hautes fréquences, tel qu'observé expérimentalement; ce couplage est évidemment absent dans les BS non-protonées.

Pour des bases de Schiff protonées dans différents solvants et différentes protéines, l'intensité de ce couplage peut varier beaucoup. Il en résulte alors des variations concomitantes de la fréquence d'élongation C=N observée, lesquelles seront indépendantes de la constante de force C=N (Kakitani et coll., 1983).

Une indication, complètement indépendante, de l'importance de la vibration de pliement C=N-H sur la position de l'élongation C=N est fournie par l'effet isotopique du deutérium. Il est plutôt étonnant que le déplacement des

fréquences observé par la deutériation de la BS soit significativement plus petit pour la bR native (Lewis et coll., 1974; Turner et coll., 1979) que pour la rhodopsine visuelle (Oseroff et Callender, 1974) (17 et  $30\text{cm}^{-1}$  respectivement). Ceci n'est pas seulement une coïncidence. Tous les analogues de la bR qui ont été étudiés ont de plus petit déplacements par la deutériation que la rhodopsine. Ceci est une bonne indication que la valeur de ces déplacements reflète l'environnement immédiat de la BS, lequel varie selon les protéines impliquées (Kakitani et coll., 1983).

Ces observations suggèrent que les effets environnementaux sur le pliement C=N-H mènent aux anomalies observées dans les fréquences d'élongation C=N et aux effets isotopiques du deutérium. En fait, pour les rétinal aldéhydes et les BS non-protonées, où le pliement C=N-H est absent, la corrélation entre la longueur d'onde maximale d'absorption et la fréquence d'élongation C=N(ou C=O) est observée (Heyde et coll., 1971).

La fréquence d'élongation C=N est donc principalement déterminée par deux facteurs: la constante de force d'élongation C=N et le degré de couplage avec le mouvement de pliement. Cependant, le déplacement isotopique du deutérium est déterminé presque exclusivement par le degré de couplage, lequel est principalement une propriété de l'environnement de la BS dans le site de liaison du chromophore. Les déplacements causés par la deutériation de la bR native et de ses analogues sont

d'environ la moitié de ceux de la rhodopsine qui possède une protéine différente. Il y a tout lieu de croire qu'un groupement de la protéine, lié de façon non-covalente dans le voisinage de la liaison de la BS, interagit avec la BS protonée mais pas avec la BS non-protonée (Marcus et Lewis, 1978; Kakitani et coll., 1983). Une telle interaction faisant intervenir le proton de la BS peut expliquer les deux effets observés sur la vibration  $C=N+H$  et l'absence de ces effets sur la vibration  $C=N$ . Ainsi, il est clair que, quoique la protéine ne procure pas de bandes dans le spectre RR, l'environnement de la protéine influence fortement le caractère du spectre vibrationnel des chromophores. Ceci est appuyé par le modèle de charge ponctuelle externe pour la bR native selon lequel le maximum d'absorption du chromophore est modulé par des interactions électrostatiques provenant de la protéine.

Dans le cas de la bR480, la deutériation induit un déplacement de  $30\text{cm}^{-1}$ , comparativement à celui de la bR native qui est de  $17\text{cm}^{-1}$ . Etant donné que le déplacement provoqué par la deutériation est seulement causé par le degré de couplage avec la vibration  $C=N-H$  et que ce dernier est influencé par l'environnement de la protéine, nous pouvons penser que la différence entre les déplacements causés par la deutériation dans la bR480 et la bR570 est une indication d'un changement des interactions BS-protéine lors de la délipidation de la bR native. Le couplage entre le pliement  $C=N-H$  et l'élongation  $C=N+H$  est ainsi plus fort dans la bR480 ce qui suggère que

l'interaction du chromophore avec la protéine est diminuée, donc que le contre-ion se serait éloigné de la BS et que, conséquemment, la BS dans la bR480 serait plus protonée qu'elle l'est dans la bR native.

### 3.4.3 Région du "fingerprint"(empreinte) du chromophore

#### 3.4.3.1 Résultats

Par la comparaison des figures (16) et (17), il est évident que les spectres RR de bR480 et de bR délipidée dispersée dans le lauryl sucrose (bRI480/540ILS) comportent des différences substantielles dans la région entre 1100 et 1250 $\text{cm}^{-1}$ . Cette étendue spectrale fait partie de la région appelée l'empreinte de l'isomère, et elle est affectée par quelques attributs structuraux du chromophore: le groupement terminal et la forme isomérique du rétinol (Callender et Honig, 1977; Mathies et coll., 1977; Doukas et coll., 1978; Braiman et Mathies, 1980; Pande et coll., 1981).

#### 3.4.3.2 Discussion

Puisque nous savons maintenant que bR480 possède une BS protonée, tout comme bR570, comme groupement terminal, il serait tentant de croire que différents isomères soient présents. Cependant, des interactions entre le chromophore et la protéine environnante pourrait aussi modifier de façon concevable le spectre des chromophores "in situ" comparativement aux chromophores modèles en solution, mis à

part les effets des formes isomériques du rétinal (Pande et coll., 1981). En effet, dans la bR native, le chromophore montre des bandes vibrationnelles caractéristiques qui ne sont pas observées dans les spectres références des BS correspondantes de rétinal avec des alkylamines en solution. Ceci implique donc que chaque chromophore est modulé de façon caractéristique par des interactions avec la protéine (Massig et coll., 1982). Ainsi, la bR480 dans l'eau montre des bandes à 1164 et 1208 $\text{cm}^{-1}$  tandis que la bRI480/540ILS montre des bandes à 1160, 1173, 1200 et 1209 $\text{cm}^{-1}$ . Si nous comparons les spectres de bR480 et bRI480/540ILS aux spectres de bR570 et de chromophores modèles en solution (figure 18 et 19), nous nous apercevons que la région entre 1100 et 1250 $\text{cm}^{-1}$  (fingerprint, C-C, C-C-H) dans le spectre de bR480 s'apparente de très près à celle du spectre(c) des chromophores modèles en solution (1164 et 1198 $\text{cm}^{-1}$ ) tandis que le spectre de bRI480/540ILS coïncide de près avec celui de bR570 (1170, 1201 et 1214 $\text{cm}^{-1}$ ). Ainsi, lors de la délipidation (bR480), les interactions rétinal-protéine semblent être diminuées ce qui nous porte à croire que les interactions lipides-protéines sont impliquées dans la modulation des interactions rétinal-protéine, c'est-à-dire que la structure native de la protéine est maintenue par des interactions lipidiques. Ainsi, les chromophores liés aux protéines semblent être de bonnes sondes spectroscopiques sensibles aux changements qui prennent place dans l'environnement des protéines au cours de leur fonction.

Des études effectuées par Sheves et coll.(1984) sur les pigments artificiels, dans lesquels la portion rétinale des pigments natifs a été substituée par des analogues synthétiques ont fourni un outil précieux dans l'étude du site de liaison de la bR. Il a été montré que les spectres des pigments de bR sont sensibles aux modifications ayant lieu dans la région de l'anneau de la molécule de rétinale (Umadevi et coll., 1983). Ainsi, une étude systématique des effets causés par l'introduction d'encombrement stérique dans le voisinage de l'anneau a été effectuée par la préparation de rétinals modifiés, substitués à la position C<sub>4</sub> de l'anneau par des groupements de différents grosseurs ou encombrements: 1.R=H, 2.R=OH, 3.R=CH<sub>3</sub>, 4.R=(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> et 5.R=N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Les spectres d'absorption des pigments 3 et 4 montrent que la bande d'absorption principale est déplacée vers le bleu à 465nm avec un petit épaulement de la bande rouge à 550nm tandis que le pigment 5 n'absorbe qu'à 465nm et les spectres de RR de ces échantillons ont confirmé que ces pigments possèdent une BS protonée. Il est donc évident que les changements de 1 à 5 sont causés par une réduction graduelle de l'intensité de la bande rouge et une augmentation parallèle de celle de la bande bleue. Ces observations nous indiquent alors la présence de deux espèces de pigments caractérisés par des interactions rétinale-protéine différentes. Ainsi, dans ce cas, le rétinale pourrait adopter au moins deux configurations différentes lorsqu'il occupe le site de liaison de l'opsine. Seulement une



conformation est observée dans la bR(1), dans laquelle la bande d'absorption rouge indique une très grande proximité entre l'anneau et une charge de l'opsine(Nakanishi et coll., 1980) et la seconde conformation, favorisée par l'augmentation d'encombrement stérique dans la région du C<sub>4</sub> de l'anneau, est associée à un déplacement hypsochrome important de l'absorption. L'effet a été attribué à une augmentation de la séparation entre l'anneau du polyène et la charge ou la paire de charges de l'opsine. Cette espèce absorbant dans le bleu(465nm) a un maximum d'absorption qui est très près de celui de la bR délipidée(480nm) et des chromophores en solution(440nm), ces derniers n'ayant évidemment pas de charges voisines à l'anneau. Ceci nous donne une indication supplémentaire qu'il se produit un éloignement des charges électrostatiques de la bactéριοopsine dans la bR délipidée, causé par une diminution des interactions chromophore-protéine lorsque les lipides sont absents.

Une preuve que les interactions qui modulent le maximum d'absorption dans la bR480 s'apparentent de très près à celles des pigments artificiels(bR465) réside dans l'étude de leur photocycle respectif. Sheves et coll.(1984) ont démontré que les photocycles des pigments 3 et 4 sont dépendant de la longueur d'onde d'excitation, tout comme nous l'avons antérieurement démontré pour la bR délipidée. Ainsi dans les deux cas(bR480 et bR465), l'excitation à 580nm mène à une batho-bR ayant les caractéristiques de la bR native et

absorbant à 610nm tandis que l'excitation à 440nm mène à un bathoproduit ayant deux maximum dans le rouge: 520 et 620nm.

Il est donc pertinent de croire que cette charge de l'opsine se serait éloignée de l'anneau du rétinol, et donc que bR480 se rapproche structuralement d'un chromophore modèle en solution(440nm). Dans la discussion de la région C=N, nous avons conclu que le contre-ion de l'azote s'est aussi éloigné. Nous savons que lorsque l'on éloigne ce contre-ion, nous devons nous attendre à un déplacement bathochrome de la bande d'absorption du pigment puisque la charge positive de l'azote est moins neutralisée. C'est ce qui se produit par exemple dans l'intermédiaire bK610 (batho-bR) lors de la séparation de charge qui est associée à la transition  $bR570 \rightleftharpoons bK610$ . Ainsi, en considérant que nous n'avons plus ou presque plus de charge en interaction avec l'anneau, la valeur du maximum d'absorption de la bR délipidée devrait se déplacer vers le rouge par rapport aux chromophores modèles en solution et c'est exactement ce qui se produit; nous obtenons un déplacement bathochrome de 40nm pour la bR480, ce qui est en accord avec l'éloignement du contre-ion de l'azote.

#### 3.4.4 Discussion générale

Plusieurs évidences expérimentales nous permettent d'affirmer qu'il se produit des changements dans l'interaction

chromophore-protéine lors de la délipidation de la bactériorhodopsine :

- 1) La fréquence du mode d'élongation  $C=C$  dans la bR480 est approximativement la même que celle des chromophores modèles en solution, lesquels n'ont pas d'interactions électrostatiques (provenant de l'opsine) au niveau de l'anneau ionone du rétinol. Par conséquent, il semble que les électrons sont moins délocalisés dans la bR480 que dans la bR native, ce qui suggère une diminution dans les interactions rétinol-protéine si on se réfère au modèle de charge ponctuelle externe pour la bactériorhodopsine.
- 2) Dans la bR480, la base de Schiff est protonée, tout comme dans le chromophore natif puisque nous observons un déplacement de  $30\text{cm}^{-1}$  à la deutériation du proton de l'azote de la BS.
- 3) Ce déplacement isotopique de l'élongation  $C=N+H$  est déterminé presque exclusivement par le degré de couplage avec le mouvement de plissement. L'importance de cette contribution est principalement une propriété de l'environnement créé par la protéine autour du site de liaison du chromophore; il y a donc des variations dans les valeurs des déplacements induits par la deutériation dépendant des protéines impliquées.
- 4) Ainsi, la différence entre les déplacements causés par la deutériation dans la bR480 ( $30\text{cm}^{-1}$ ) et la bR570 ( $17\text{cm}^{-1}$ ) est une indication d'un changement des interactions BS-protéine se

produisant lors de la délipidation de la bR native. Ce couplage plus fort entre le plissement et l'élongation  $C=N+H$  pour bR480 suggère que le contre-ion est éloigné de l'azote et que conséquemment, la BS dans la bR480 est plus protonée que dans la bR native.

- 5) La région du "fingerprint" ( $1100-1250\text{cm}^{-1}$ ) du spectre de bR480 s'apparente de très près à celle des chromophores modèles en solution.
- 6) Les spectres d'absorption et le photocycle des pigments artificiels sont comparables à ceux de bR480 lorsque sont introduits des groupements provoquant de l'encombrement stérique dans la région de l'anneau ionone du rétinol, ce qui supporte les autres arguments en ce qui concerne l'augmentation de la séparation entre la protéine et le rétinol dans la bR480.
- 7) En admettant que la charge négative de l'anneau se soit éloignée, le déplacement bathochrome de 40nm dans la bR480 par rapport aux chromophores modèles en solution (440nm) est causé par la séparation plus grande du contre-ion de l'azote.
- 8) Lorsque la bR délipidée est dispersée dans le lauryl sucrose (bRI480/540ILS), nous apercevons un changement dans le maximum d'absorption de 480 à 540nm (dépendant du pH) ainsi que des différences caractéristiques dans les spectres RR par rapport à la bR480. Le spectre RR ressemble alors beaucoup plus

à celui de la bR570. Il semble donc que le lauryl sucrose mime quelques propriétés des lipides et redonne à la bR les interactions rétinale-protéine natives qui la gouvernent.

Ces résultats nous suggèrent qu'un résidu quelconque de la protéine, possédant un pK qui est sensible aux interactions lipides-protéines, est responsable de la transition observée. Les changements de pK sont présumément reliés aux changements structuraux de la protéine lesquels peuvent résulter de la perte d'interactions lipides-protéines lors de la délipidation. Ces changements semblent affecter en particulier la région de la base de Schiff, causant ainsi des perturbations électroniques au niveau du chromophore, ce qui donne lieu au déplacement hypsochrome observé dans le maximum d'absorption.

De plus, dans la bR460 obtenue du traitement des membranes pourpres avec du diméthyl sulfoxyde, les spectres Raman de résonance montrent que le chromophore est lié à la protéine par un lien de base de Schiff protonée (Pande et coll., 1986) tout comme dans la bR480 obtenue par la délipidation de la bR. De même, la fréquence du mode vibrationnel de la base de Schiff, et la grandeur de son déplacement à la deutériation, sont quelques peu différents de ceux reportés pour la bR560 native, et sont en fait, semblables à ceux observés pour les bases de Schiff protonées des chromophores modèles en solution. Ceci suggère une fois de plus que les interactions protéine-chromophore sont minimales près de la base de Schiff dans la bR460(DMSO) (Pande et coll., 1986) donc aussi dans la bR480(délipidée). De plus, une comparaison des spectres infrarouges

de bR560 et bR460 suggère que la formation de bR460 est associée à des changements structuraux de la protéine. Ces changements ont été attribués (Pande et coll. 1986) à l'ouverture de la structure de la bactériorhopsine, causant un déplacement du ou des contre-ion(s) de la protéine responsables de la position du  $\lambda_{\text{max}}$  observé dans la bR560 native ("opsin shift").

Les interactions lipides-protéines semblent donc être impliquées dans la modulation des interactions spécifiques rétinal-protéine, ce qui nous porte à croire que l'intégrité structurale et fonctionnelle de la bactériorhodopsine est maintenue et protégée par des interactions lipidiques.

### 3.5 Spectroscopie d'émission

#### 3.5.1 Principe

Lorsque la bR purifiée est dispersée dans l'octyl glucoside 50mM (pH 7), son maximum d'absorption subit un déplacement pour se situer entre 480 à 540nm. Par contre, lorsque nous ajoutons une concentration moindre d'octyl glucoside, i.e. 12mM (ce qui est en-dessous de la CMC de ce détergent), le maximum d'absorption de la bR demeure identique à celui obtenu sans détergent, i.e. 480nm).

Nous avons donc mesuré l'émission de fluorescence, dans l'ultra-violet, de ces différents échantillons lorsque l'excitation s'effectue dans la bande d'absorption des acides aminés aromatiques tyrosine (Tyr) et tryptophane (Try), c'est-à-dire à 280nm, afin de voir si les spectres d'émission présentent des différences significatives causées par un changement structural de la protéine, puisque les changements conformationnels des protéines peuvent affecter leur fluorescence intrinsèque.

#### 3.5.2 Résultats

Les échantillons de bR délipidée dispersée dans les détergents ont été excités dans la bande d'absorption à 280nm et les spectres d'émission sont montrés à la figure (21). Ces spectres résultent de la différence obtenue entre les spectres d'émission de la bR480 en solution dans l'octyl glucoside (50mM et 12mM) et les spectres d'émission de chacun de ces détergents. Le spectre d'émission de la

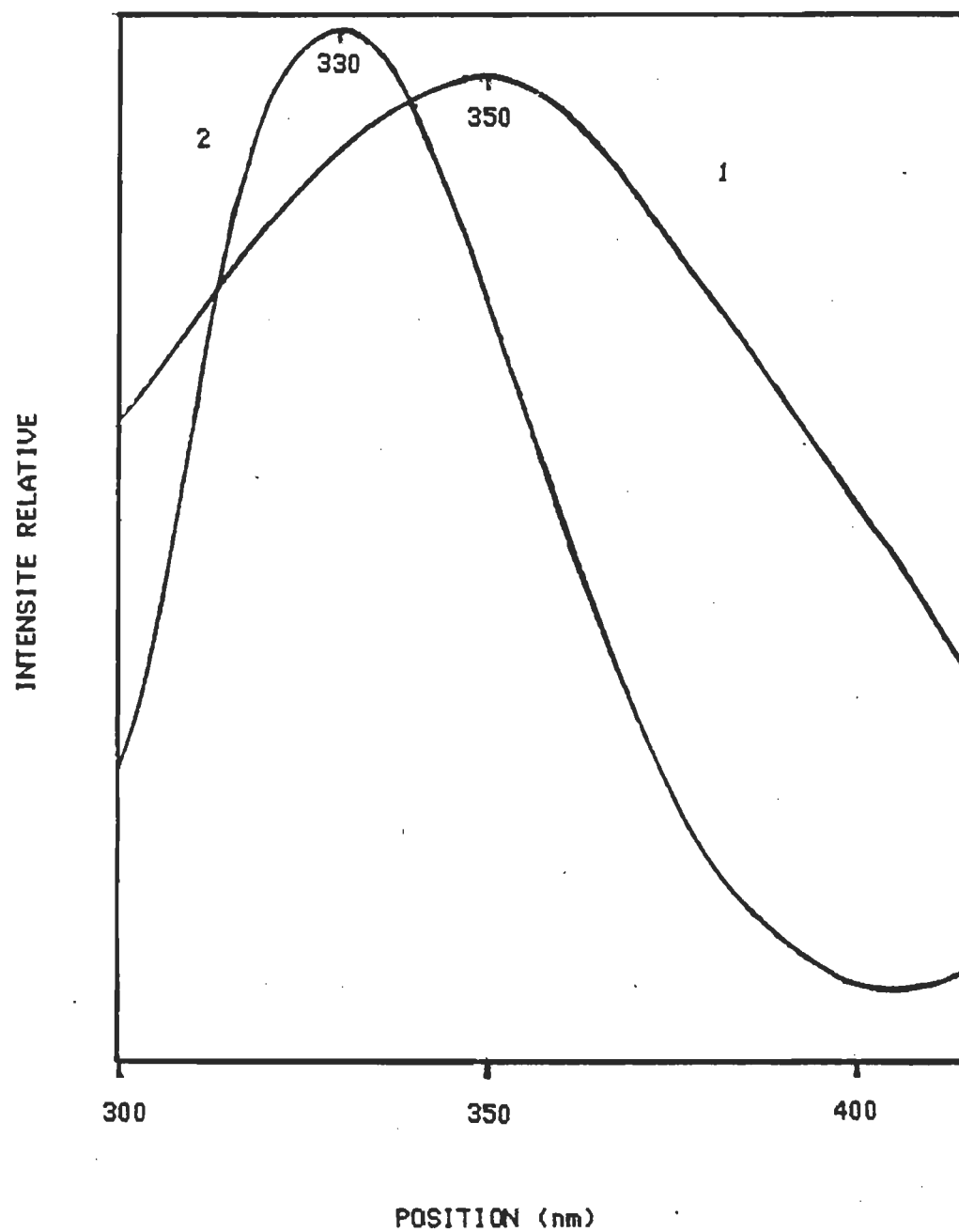


Figure 21: Spectres d'émission de la bR délipidée dispersée dans l'octyl glucoside:

(1): 12mM ( $\lambda_{\text{max}}$ =480nm)

(2): 50mM ( $\lambda_{\text{max}}$  540nm)



bR480/octyl glucoside (50mM) est montré par la courbe (2). Ce spectre montre un maximum d'émission qui se situe à 330nm. Cependant, en ce qui concerne le spectre d'émission de la bR480 (12mM O.G.) on s'aperçoit par la courbe (1) que le maximum d'émission subit un déplacement bathochrome pour se positionner à 350nm.

### 3.5.3 Discussion

Dans la MP native, le maximum d'émission, lorsque l'excitation se produit entre 260 et 300nm, est caractérisé par une bande large autour de 330nm (Oesterhelt et Hess, 1973; Schreckenback et Oesterhelt, 1977; Bogomolni et coll., 1978; Sherman, 1981). Cette bande d'émission correspond à la fluorescence provenant de façon prédominante des Try, avec des contributions indirectes provenant du transfert d'énergie des Tyr au Try. La bande d'émission des Try est sensible au microenvironnement de ce résidu (Burstein et coll., 1973) et peut nous donner des informations importantes concernant la structure tertiaire de la protéine. En effet, lorsque la MP est mise en présence de chlorhydrate de guanidine (un agent dénaturant), la bande d'émission subit un déplacement vers les plus longues longueurs d'onde, c'est-à-dire vers 337nm (Sherman, 1981), ce qui est près de la valeur attendue pour une protéine complètement dénaturée dans laquelle tous les résidus Try sont exposés (355nm) (Burstein et coll., 1973). Ce déplacement a été attribué soit à des changements de conformations de la protéine et/ou soit à des interactions lipides-protéines. De plus, l'excitation d'une solution

de L-Try dans l'eau à pH neutre donne une bande d'émission à 350nm (Sherman, 1981). Selon une analyse effectuée par Burstein et coll. (1973), il semble que le maximum d'émission à 330nm observé dans la MP native correspond à des résidus Try situés dans des sites très hydrophobes de la membrane tandis que l'émission vers 350nm serait typique des Try exposés à un environnement aqueux. Ainsi, il serait raisonnable de croire que dans la bR480 ( $\lambda_{\text{max}}$  d'émission=350nm) les changements de fluorescence observés par rapport à la bR570 dans la MP native ( $\lambda_{\text{max}}$  d'émission=330nm) proviennent d'un changement conformationnel de cette protéine lors de la délipidation, modifiant ainsi la disposition spatiale des résidus Try, les exposant alors à un environnement aqueux par opposition à un environnement très hydrophobe lorsque la bR est contenue dans la MP.

En ce qui concerne la largeur de bande à mi-hauteur, la bande d'émission obtenue de la bR/O.G. 50mM ( $\lambda_{\text{max}}$  d'absorption vers 540nm) est de valeur comparable à celle obtenue de la bR dans la MP (54nm et 60nm respectivement). Cependant, la bR480 ( $\lambda_{\text{max}}$  d'absorption=480nm) montre une bande d'émission beaucoup plus étendue, ce qui pourrait s'expliquer par l'état d'agrégation de la bR480 et aussi par le fait que ce paramètre de fluorescence augmente lorsque les Try sont plus exposés à un environnement polaire (Sherman, 1981; Andley et Chakrabarti, 1982).

### 3.6 Effet de l'hydroxylamine et du borohydrure de sodium

#### 3.6.1 Principe

Le blanchiment de la membrane pourpre à la lumière en présence d'hydroxylamine implique la perte du lien de base de Schiff entre le rétinale et l'apoprotéine et la conversion du rétinale en rétinaleoxime causée par la réaction entre le rétinale et le résidu aminé de l'hydroxylamine. Ce processus résulte en la diminution de la bande d'absorption à 570nm et en l'apparition simultanée d'une bande à 366nm caractéristique du rétinaleoxime. Il se produit donc des changements significatifs dans l'organisation moléculaire et dans la conformation de la bR dans la MP à l'illumination. D'autre part, le borohydrure de sodium agit en réduisant la double liaison de la base de Schiff résultant en la diminution progressive de la bande à 570nm et en la formation d'une bande autour de 360nm ayant plusieurs épaulements caractéristiques de la réduction du lien aldimine entre le rétinale et la bactérioropsine. L'hydroxylamine et le borohydrure réagissent avec la bR seulement lorsqu'on illumine les échantillons de bR adaptée à la lumière. Au cours du photocycle normal de la MP, il y a déprotonation de la base de Schiff, isomérisation du rétinale et des changements concomitants de la conformation de la protéine. C'est alors que le site de liaison de la base de Schiff devient accessible à la réaction avec l'hydroxylamine ou à la réduction par le borohydrure de sodium. Nous avons donc utilisé ces produits pour déterminer si la bR délipidée a une conformation différente au point où elle pourrait réagir, c'est-à-dire au point où la base de Schiff

pourrait être accessible et réagir à l'obscurité avec ces produits.

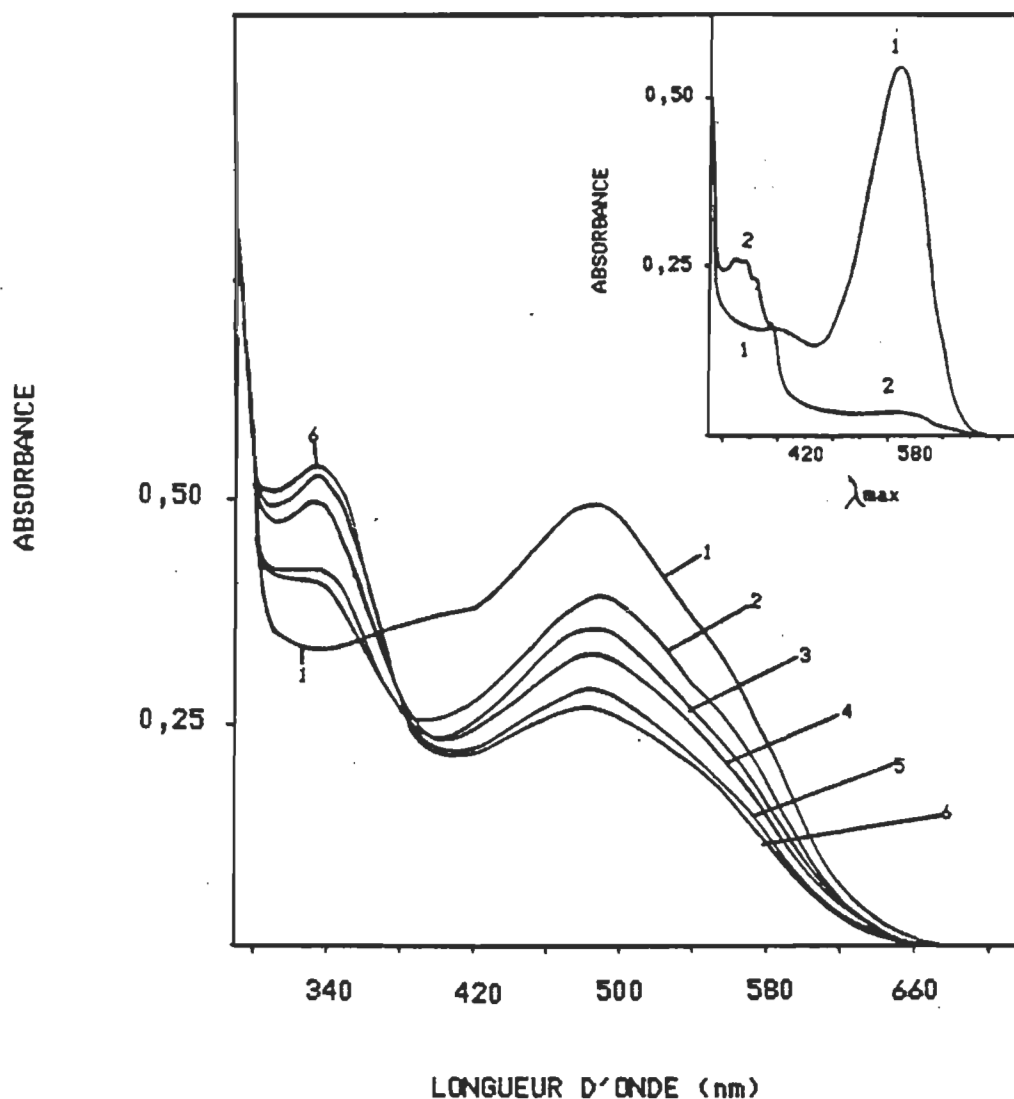
### 3.6.2 Réaction au borohydrure

#### 3.6.2.1 Résultats

L'analyse spectrale de la bR délipidée traitée avec environ 4% (p/v) de  $\text{NaBH}_4$  à l'obscurité est montrée à la figure (22). Nous pouvons observer qu'il y a disparition graduelle de la bande d'absorption correspondant au chromophore et apparition simultanée d'une nouvelle bande vers 335nm correspondant à la réduction de la double liaison de la BS dans ce pigment. Cette réaction se produit assez rapidement de telle sorte qu'après 1:30 heure la moitié de la bR est dénaturée.

#### 3.6.2.2 Discussion

Lorsque la bR contenue dans la MP est traitée au borohydrure de sodium (vignette, figure 22), la bande d'absorption à 570nm disparaît et il se forme un spectre d'absorption ayant 4 maxima dans la région entre 320 et 380nm (327, 343, 361 et 382nm). Cette structure fine de la bande d'absorption obtenue lorsque les MP réagissent avec le  $\text{NaBH}_4$  disparaît lorsque la membrane pourpre subit soit une prédénaturation ( $\lambda_{\text{max}}$  est alors à 380nm) avec certains détergents ou soit une hydrolyse alcaline et alors la bande d'absorption est positionnée à 330nm (Peters et coll., 1976; Schreckenback et Oesterhelt, 1977; Schreckenback et coll., 1977). Le déplacement de la bande jusqu'à 330nm ainsi que la



**Figure 22:** Evolution de la bactériorhodopsine délipidée (bR480) en présence de  $\sim 4\%$  (p/v) de borohydrure de sodium à l'obscurité.

Le spectre (1) correspond à la bR480 dans un tampon phosphate 50mM, pH=7. Les spectres (2-6) sont enregistrés à: (2) 1 minute, (3) 10 minutes, (4) 30 minutes, (5) 1 heure, (6) 1:30 heure après l'addition de NaBH<sub>4</sub>.

**Vignette:** changements spectraux observés lors de la réaction du NaBH<sub>4</sub> avec la membrane pourpre native.

(1): membrane pourpre native

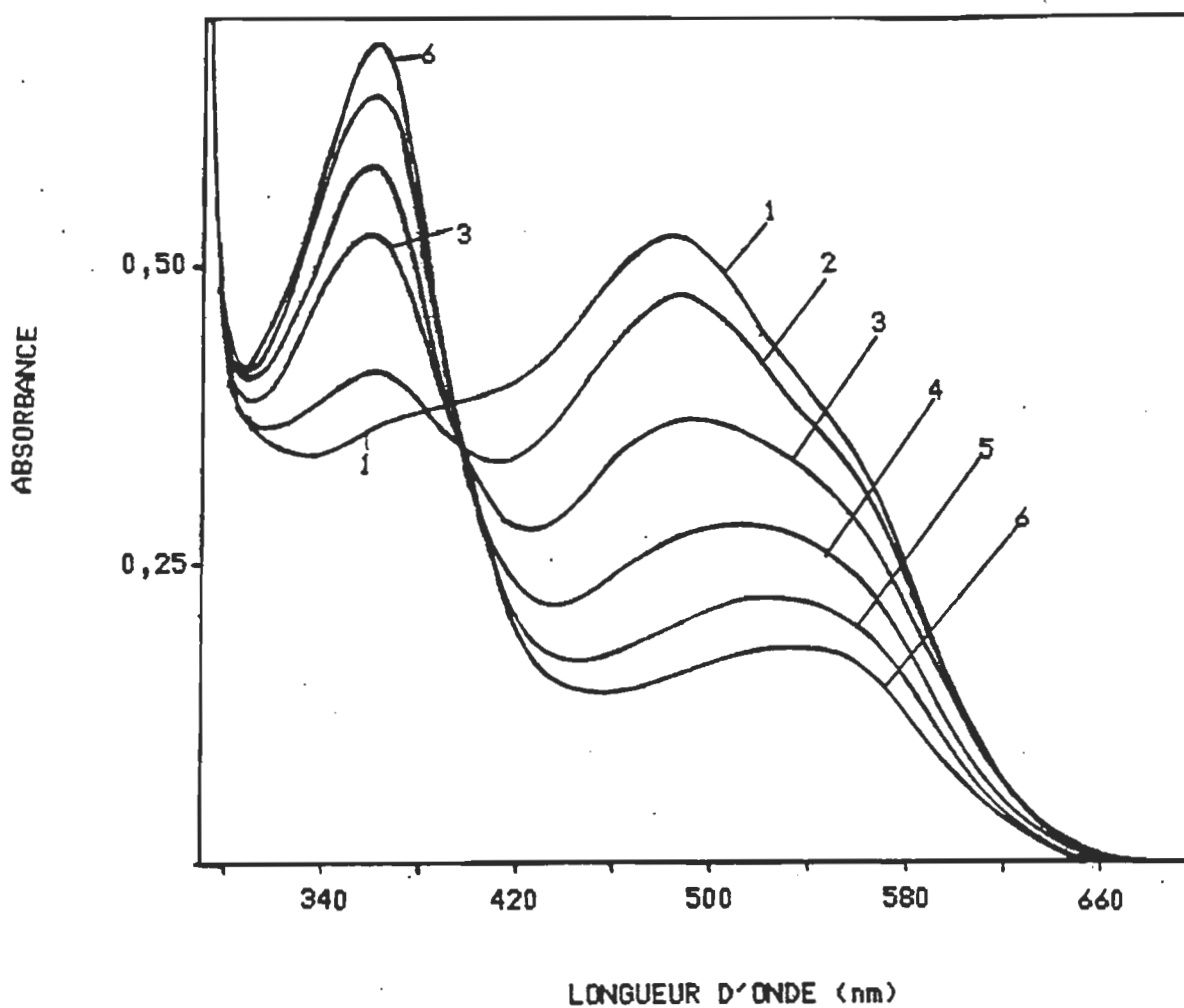
(2): 4:30 heures après l'addition de NaBH<sub>4</sub> sous irradiation continue des MP natives.

perte de la structure fine de la bande ont été attribués (Schreckenback et Oesterhelt, 1977; Schreckenback et coll., 1977) à des modifications des interactions rétinalprotéine se produisant dans la bR dans les cas ci-haut mentionnés. On pourrait donc penser que le même phénomène se produit dans la bR délipidée puisque la position de la bande d'absorption après l'attaque au borohydrure, dans ce cas-ci, est aussi à 330nm et qu'elle ne montre pas de structure fine comme celle que l'on retrouve lors de la réduction de la MP native.

### 3.6.3 Reaction à l'hydroxylamine

#### 3.6.3.1 Résultats

La figure (23) nous montre l'évolution de la bactériorhodopsine délipidée en présence d'hydroxylamine à l'obscurité. Nous observons que l'une des deux formes spectrales de la bR purifiée réagit beaucoup plus rapidement que l'autre au traitement à l'hydroxylamine. En effet, la forme spectrale absorbant à 480nm réagit spontanément et ceci peut être observé par la diminution de la bande d'absorption à 480nm et l'augmentation simultanée de la bande à 360nm caractéristique de la formation de rétinaloxime. Dépendant de la concentration d'hydroxylamine utilisée, cette réaction est plus ou moins rapide et en utilisant une concentration plus faible nous sommes en mesure de voir disparaître peu à peu la bande à 480nm. En effet, 1:30 heure après l'ajout de 3 gouttes d'hydroxylamine (1 M) à l'échantillon, la bande à 480nm a



**Figure 23:** Evolution de la bactériorhodopsine délipidée (bR480) en présence d'hydroxylamine à l'obscurité.

Le spectre (1) correspond à la bR480 dans un tampon phosphate 50mM, pH=7. Les spectres (2-6) sont enregistrés à: (2) 20 secondes, (3) 20 minutes, (4) 45 minutes, (5) 1:30 heure, (6) 3 heures après l'addition de 3 gouttes d'hydroxylamine (1 M) à la bR480.

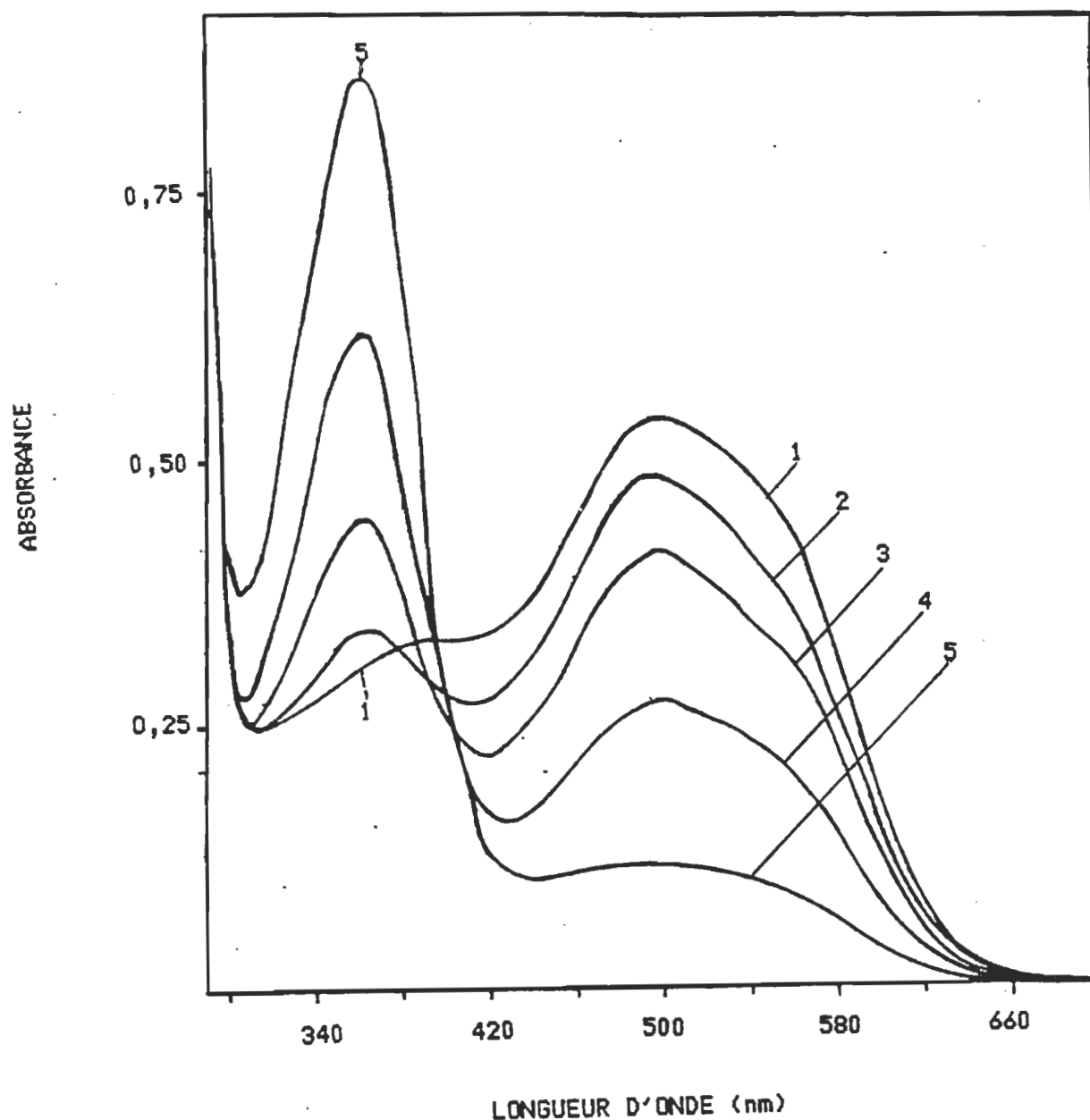
complètement disparu. En ce qui concerne le pigment absorbant à 540nm, il semble qu'il soit plus résistant à l'action de ce produit, cependant il finit par disparaître à son tour mais beaucoup plus tardivement que la bR480. Alors que toute la bR480 a disparu, il faut quelques heures à la bR540 avant qu'elle ne se dénature.

Lorsque la bR purifiée est dispersée dans le lauryl sucrose ou le Triton X-100 préalablement à l'attaque à l'hydroxylamine (figure 24 et 25 respectivement), nous apercevons deux comportements différents. Dans le lauryl sucrose, la bR délipidée semble réagir beaucoup plus rapidement que dans l'état agrégé et après 1:20 heure, les deux formes spectrales à 480 et 540nm ont presque complètement disparu. Cependant, lorsque la bR est dispersée dans le Triton X-100, il y a transition de la forme bR480nm à la forme bR540, et dans ce cas il faut plus de 4:30 heures pour observer la dénaturation complète du pigment.

### 3.6.3.2 Discussion

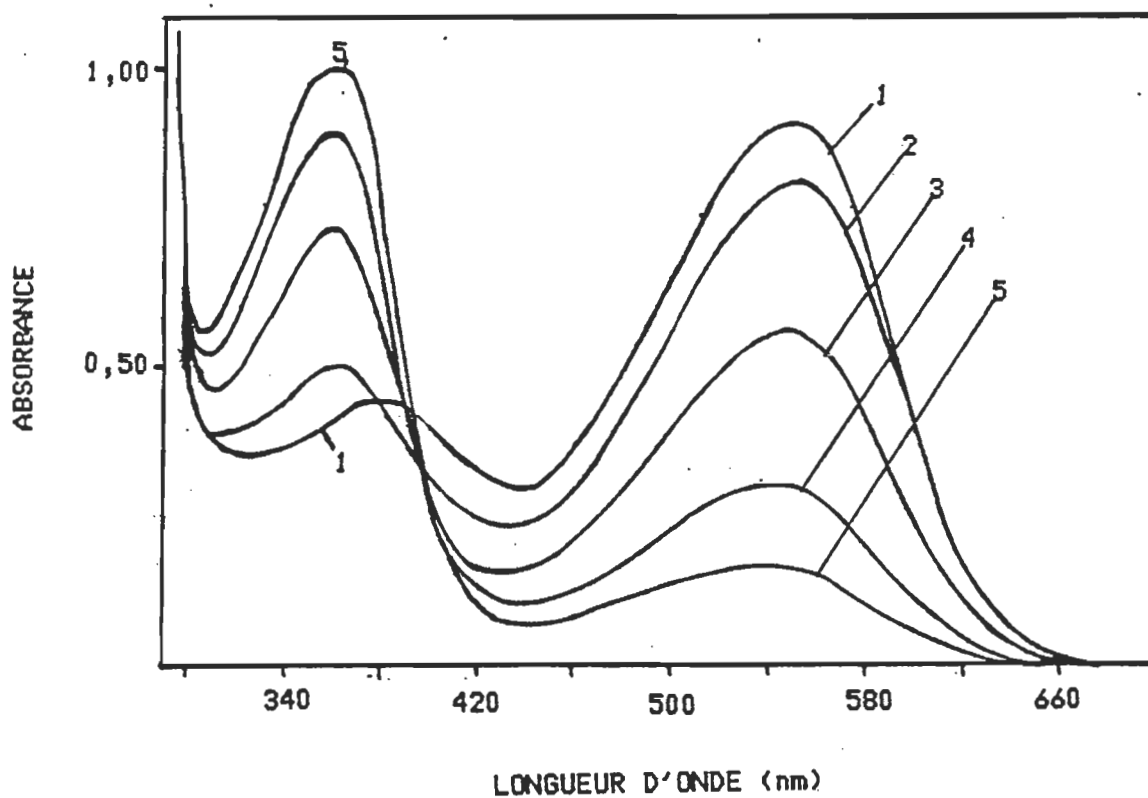
Lorsque la bR délipidée est soumise à l'action de l'hydroxylamine, la forme spectrale à 480nm disparaît beaucoup plus rapidement que la forme absorbant à 540nm. L'ajout du lauryl sucrose à la protéine purifiée augmente la vitesse avec laquelle l'hydroxylamine peut agir sur le lien de BS et ceci peut s'expliquer par la plus grande facilité pour le réactif d'accéder au site de réaction puisque la bR n'est plus agrégée





**Figure 24:** Changements spectraux observés lors de l'addition d'hydroxylamine à la bactériorhodopsine délipidée dispersée dans 0,4% (p/v) de lauryl sucrose à l'obscurité.

Le spectre (1) représente la BR purifiée dispersée dans le lauryl sucrose. Les spectres (2-5) sont enregistrés à: (2) 20 secondes, (3) 10 minutes, (4) 30 minutes, (5) 1:20 heure après l'addition de 3 gouttes de  $\text{NH}_2\text{OH}$  (1 M).



**Figure 25:** Changements spectraux observés lors de l'addition d'hydroxylamine à la bR délipidée dispersée dans 0,4% de Triton X-100.

Le spectre (1) représente la bR480 dispersée dans le Triton X-100 ( $\lambda_{\text{max}}=540\text{nm}$ ). Les spectres (2-5) sont enregistrés à: (2) 20 secondes, (3) 1 heure, (4) 2:30 heures, (5) 4:30 heures après l'addition de 3 gouttes de  $\text{NH}_2\text{OH}$  (1 M) à l'obscurité.

mais dispersée dans les micelles de détergents. Par contre, dans le Triton X-100, la réaction est moins rapide et ce phénomène est attendu puisque la forme bR540 s'y retrouvant réagit beaucoup plus lentement dans le cas de l'échantillon de bR sans détergent ( $\lambda_{\text{max}} = 480\text{nm}$ ). Nous entrevoyons donc deux possibilités afin d'expliquer les deux cinétiques de réaction à l'hydroxylamine sur le couple bR480 et bR540. Premièrement, il pourrait y avoir des différences dans l'accessibilité du site de réaction des pigments de telle sorte que l'hydroxylamine pourrait atteindre plus facilement le lien de BS dans la bR480 que dans la bR540, ainsi l'attaque s'effectuerait sur une plus longue période de temps dans la bR540 par rapport à la bR480. Deuxièmement, ceci pourrait être le résultat d'un équilibre s'établissant entre les concentrations relatives de bR480 et bR540: pendant que la bR480 se dénature, l'équilibre se déplacerait lentement vers la formation de bR480 à partir de bR540 et seulement alors la bR540 pourrait disparaître puisqu'à pH 7 la forme absorbant à 480 est privilégiée.

Il est intéressant de noter que toutes les espèces de bR dont le maximum d'absorption est déplacé vers le bleu (soit par l'addition de solvant ou autres) réagissent à l'attaque de l'hydroxylamine et du borohydure de sodium à l'obscurité alors que dans les mêmes conditions, dans la membrane native, le pigment est insensible à ce produit. Oesterhelt et coll. (1973) ont aussi observé une cinétique de réaction biphasique lorsque de l'hydroxylamine est ajoutée à des échantillons de bR/MP mis

en présence de DMSO. Ces auteurs ont alors suggéré que ce phénomène pourrait être attribué au fait que seulement la forme de bR absorbant à 460nm pouvait être attaquée par ce réactif à l'obscurité, et qu'il y aurait ensuite conversion de bR560 en bR460, processus durant lequel le lien de BS devient plus exposé donc plus susceptible de réagir à l'attaque de l'hydroxylamine. Cependant, la différence d'accessibilité de la BS entre les deux formes bR460 et bR560 dans ce cas-ci, pourrait tout aussi bien expliquer la cinétique biphasique qu'ils ont obtenue.

Quoiqu'il en soit, la disparition du pigment à l'obscurité nous donne une bonne indication que la protéine dans la forme absorbant à 480nm aurait subi des changements conformationnels suffisamment importants pour que le chromophore réagisse avec l'hydroxylamine et le borohydrure. La protéine doit ainsi se retrouver dans une conformation beaucoup plus ouverte pour qu'elle rende accessible le site de la réaction c'est-à-dire la base de Schiff qui n'est normalement pas accessible dans la membrane native. La position de la bande d'absorption à 480nm pourrait donc être la conséquence d'un changement conformationnel se produisant lorsque la protéine n'est plus en présence de ses lipides membranaires. Ce changement conformationnel pourrait ainsi rendre accessible un groupement de la protéine qui est normalement enfoui dans la structure protéique et protégé du milieu extérieur, lequel pourrait jouer un rôle dans le contrôle du maximum d'absorption de la bR.

### 3.7 Photochimie de la bR délipidée

L'étude du photocycle de la bR délipidée libérée des détergents a été effectuée par photolyse éclair, tout d'abord pour vérifier qu'il y avait toujours présence et activité photochimique dans cette forme purifiée de bR et pour comparer les cinétiques d'apparition et de disparition des intermédiaires. La spectroscopie à basse température a été utilisée par la suite afin de déterminer la position exacte du maximum d'absorption des différents photo-intermédiaires. Il sera donc possible d'établir une comparaison du photocycle de bR480 s'il y a lieu avec le photocycle de la bR contenue dans sa membrane native.

#### 3.7.1 Photolyse éclair

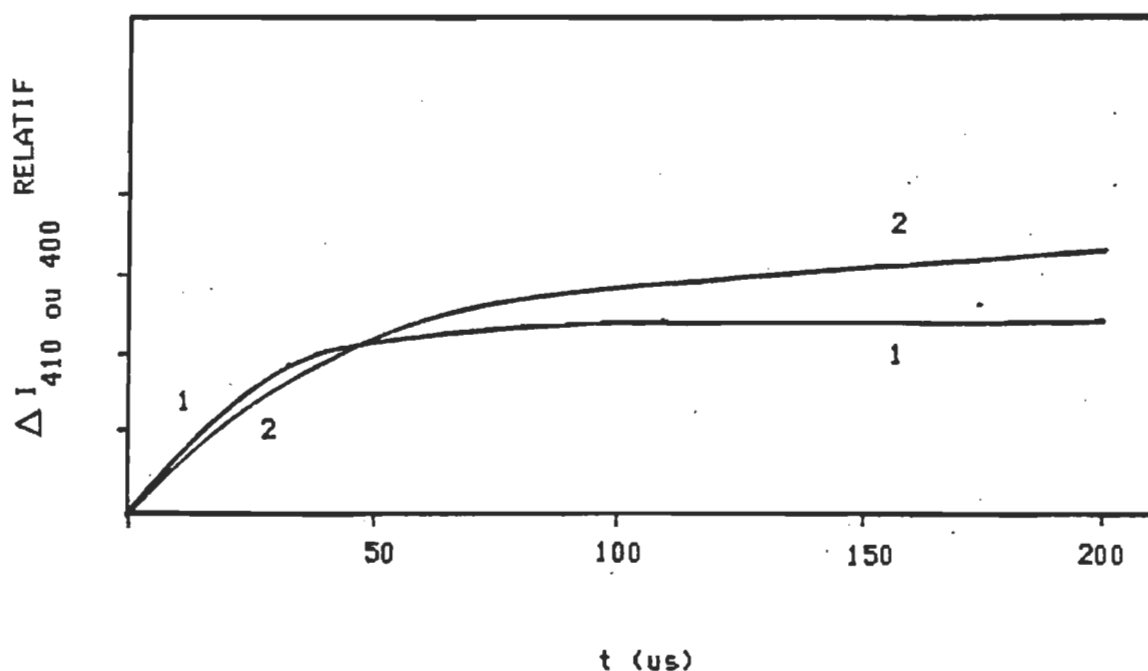
La photolyse éclair permet d'étudier les changements chimiques ou physiques rapides induits par la lumière. La réaction chimique ou physique est déclenchée à l'aide d'un faisceau actinique de très courte durée et les changements induits par la lumière sont suivis par un système d'analyse très rapide. En ce qui nous concerne, nous observons les changements d'absorption induits par l'apparition de nouvelles espèces ou par la disparition des espèces présentes lors de la réaction photochimique dans les pigments de bR.

##### 3.7.1.1 Résultats

Dans le but de déclencher le cycle réactionnel impliqué dans le photocycle de la bR délipidée, nous avons utilisé une impulsion laser ( $\lambda=532\text{nm}$ ) et l'effet produit par le faisceau

actinique est suivi par un spectrophotomètre. Immédiatement après l'excitation par l'impulsion laser, les changements de transmittance se produisant sont caractéristiques de la formation ou de la disparition de l'intermédiaire que l'on étudie. Les cinétiques de bR sont ainsi représentées par la variation de la transmittance en fonction du temps. La figure (26) représente la formation de l'intermédiaire méta-bactériorhodopsine de la bR purifiée par rapport à celle de la bR contenue dans la MP native. Dans cette expérience, la longueur d'onde du faisceau d'analyse a été fixée à 400nm dans le cas de la bR purifiée et à 410nm pour la bR dans la MP. Ces deux cinétiques semblent être du même ordre de grandeur quant à l'apparition du méta-produit de ces deux différents pigments (demie-vie apparente de 18 $\mu$ s pour la bR480 et 32 $\mu$ s pour la bR native) quoique légèrement plus rapide dans le cas de la bR480. Cependant, la cinétique de formation du méta-intermédiaire dans la MP native semble biphasique par comparaison à la méta-bR formée à partir de la bR480 qui paraît monophasique. Cette cinétique en deux phases a plusieurs fois été décrites pour la bR dans la membrane pourpre native (Lozier et coll., 1978).

La disparition des méta-intermédiaires respectifs de la bR480 et de la bR/MP est montrée à la figure (27). Contrairement à l'apparition de ce photoproduit, qui est du même ordre de grandeur, sa disparition semble être très lente dans la bR délipidée par rapport à celle du méta-intermédiaire de la bR native. Alors que le méta-produit a complètement



**Figure 26:** Cinétiques d'apparition du méta-intermédiaire de la bR délipidée (bR480) par comparaison à celle de la bR native (bR570).

La courbe (1) est mesurée à 400nm et correspond au changement spectral se produisant dans l'échantillon de bR480.

La courbe (2) est mesurée à 410nm et correspond au changement spectral se produisant dans la bR570.

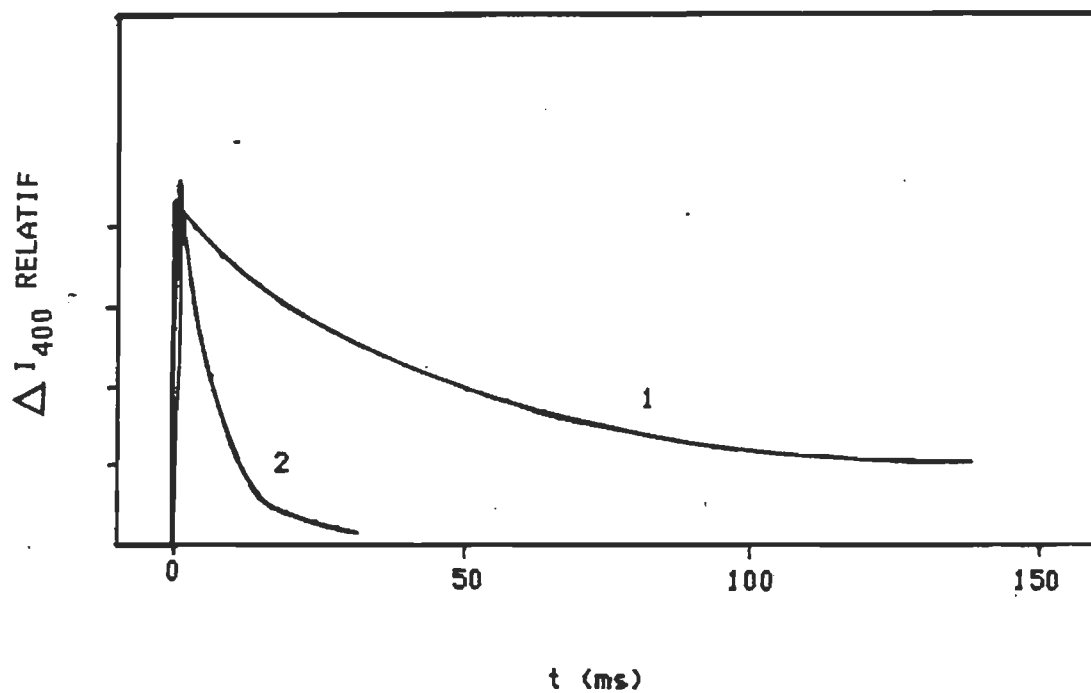


Figure 27: Cinétiques de disparition des méta-intermédiaires de la bR délipidée par comparaison à la membrane pourpre native.

Les courbes (1) et (2) sont mesurées à 400nm et correspondent aux changements spectraux se produisant dans les échantillons de bR480 et bR570 respectivement.



disparu dans les 50 ms dans la MP, la cinétique de disparition est très lente dans la bR480 et il y a toujours présence de cet intermédiaire après 150ms dans la bR délipidée. Ce retard pourrait être causé par l'état d'agrégation de la bR lorsqu'elle n'est plus en présence de ses lipides natifs. Selon Beece et coll. (1981), une augmentation de viscosité du solvant pourrait retarder les étapes lentes du photocycle ( $M \rightarrow O$ ,  $O \rightarrow bR$ ). Comme la bR est agrégée, il y a lieu de croire que ce ralentissement est dû à la grande viscosité du milieu qui entoure bR480.

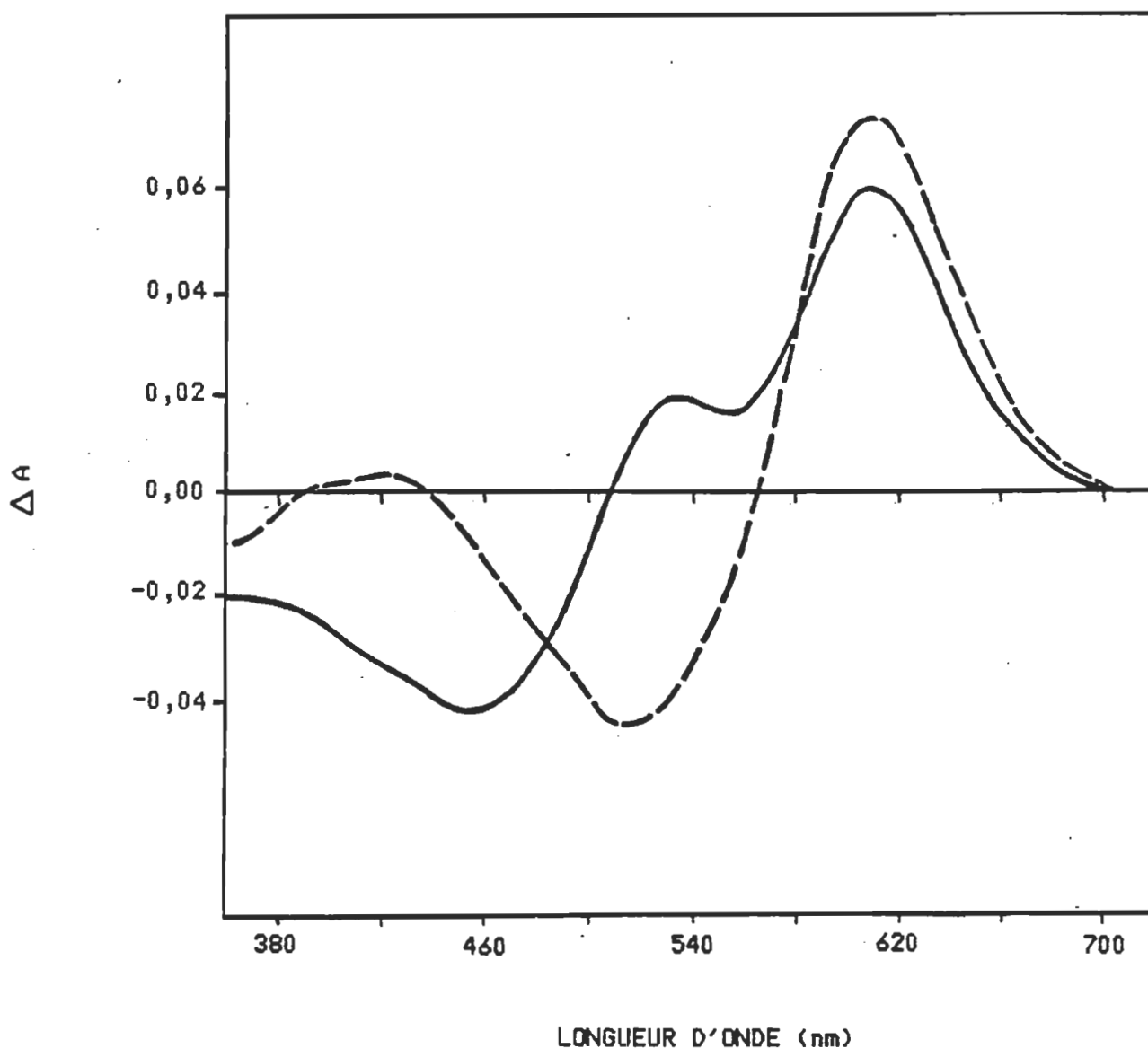
Quoiqu'il en soit, ces résultats démontrent qu'il y a toujours une activité photochimique de ce pigment, laquelle est quelque peu retardée comparativement à la bR dans la MP native.

### 3.7.2 Spectroscopie à basse température

Considérant la grandeur du déplacement spectral induit par la délipidation de la bactériorhodopsine, il nous est apparu intéressant, sachant que cette protéine conservait une activité photochimique, de regarder à quel degré les propriétés spectrales des intermédiaires retrouvés au cours du photocycle pouvaient être simultanément modifiées.

### 3.7.2.1 Résultats

La figure (28) représente les spectres de différence enregistrés après irradiation des échantillons de bR purifiée à l'aide de filtres interférentiels ayant une étroite bande passante à 450 et 550nm à une température de 80°K. Le cycle photochimique est ainsi initié et à cette température, le batho-intermédiaire est stable: il ne peut pas se transformer thermiquement en l'intermédiaire successif et il peut donc être observé. Lorsque l'échantillon est irradié avec une lumière à 550nm, on observe un minimum vers 520nm et un maximum à 610nm, ce qui correspond à la formation de la batho-bR. Par contre, l'irradiation à 450nm nous donne la formation de deux espèces de batho-produits avec des maxima vers 535 et 610nm et la disparition du pigment est associée avec le minimum situé à environ 460nm. Afin de déterminer quelle est la contribution de la bR480 dans la formation de ces photoproduits, nous avons soustrait le spectre de différence obtenu à une  $\lambda$  d'irradiation de 550nm à celui obtenu à une  $\lambda=450$ nm. Le premier de ces spectres de différence a été normalisé dans la région entre 600 et 700nm avec le deuxième spectre. Le résultat est donc un spectre de différence obtenu de la soustraction entre deux spectres de différence. Celui-ci (figure 29) nous montre clairement que la forme spectrale absorbant à 480nm forme un batho-intermédiaire absorbant vers 530nm, tandis que la bR540 a un intermédiaire bathochrome dont le maximum d'absorption est



**Figure 28:** Formation des batho-intermédiaires de la bactériorhodopsine délipidée. Spectres de différence enregistrés après 10 minutes d'irradiation de la BR délipidée à 77°K.

- (—) L'échantillon est contenu dans 60% de glycérol dans un tampon phosphate 50mM (pH=7) et irradié au travers d'un filtre interférentiel Baird Atomic à 450nm (bande passante 50nm).
- (---) L'échantillon est contenu dans 60% de glycérol dans un tampon phosphate 50mM (pH=7) et irradié au travers d'un filtre interférentiel Baird Atomic à 550nm (bande passante 50nm).

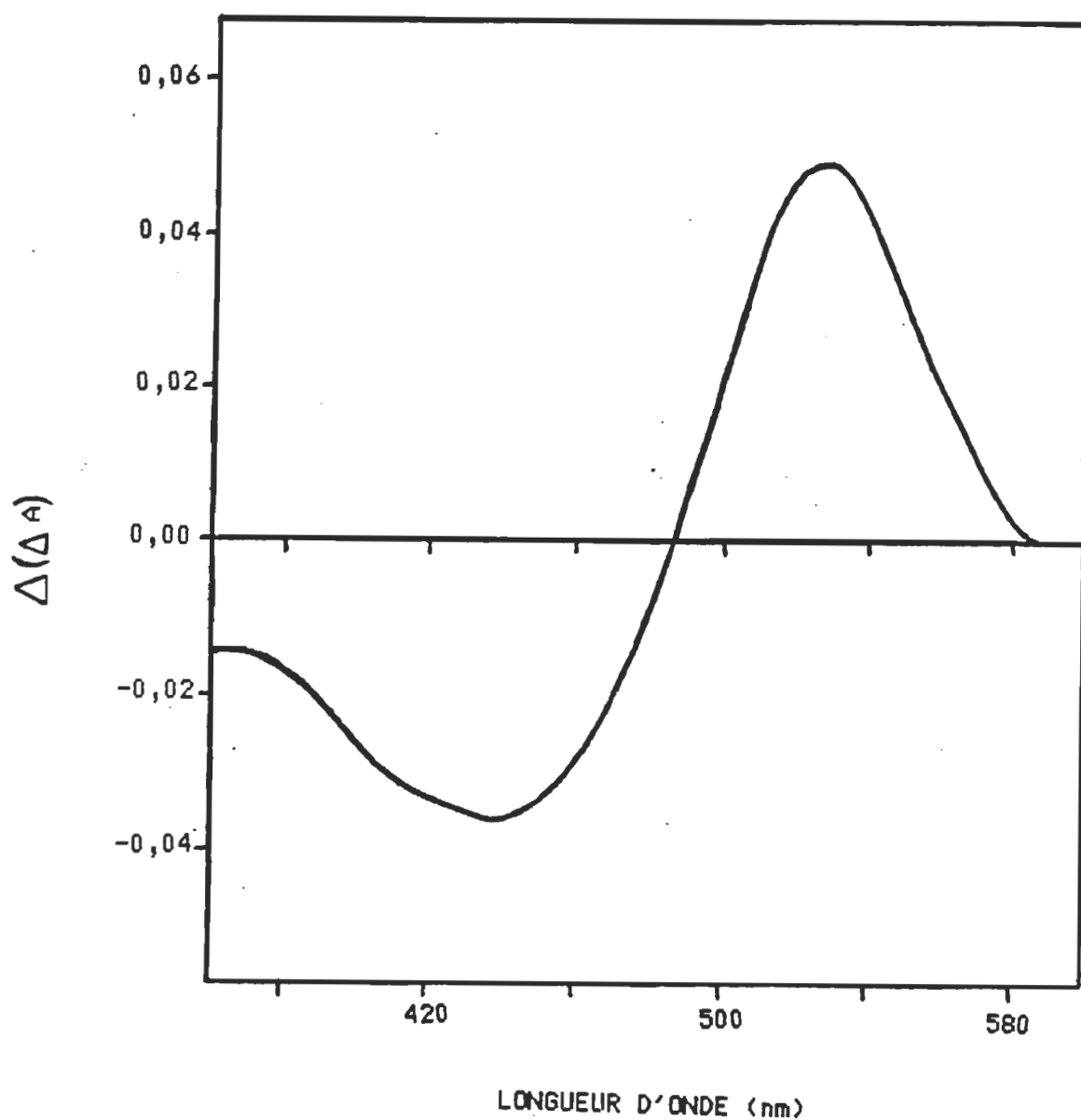
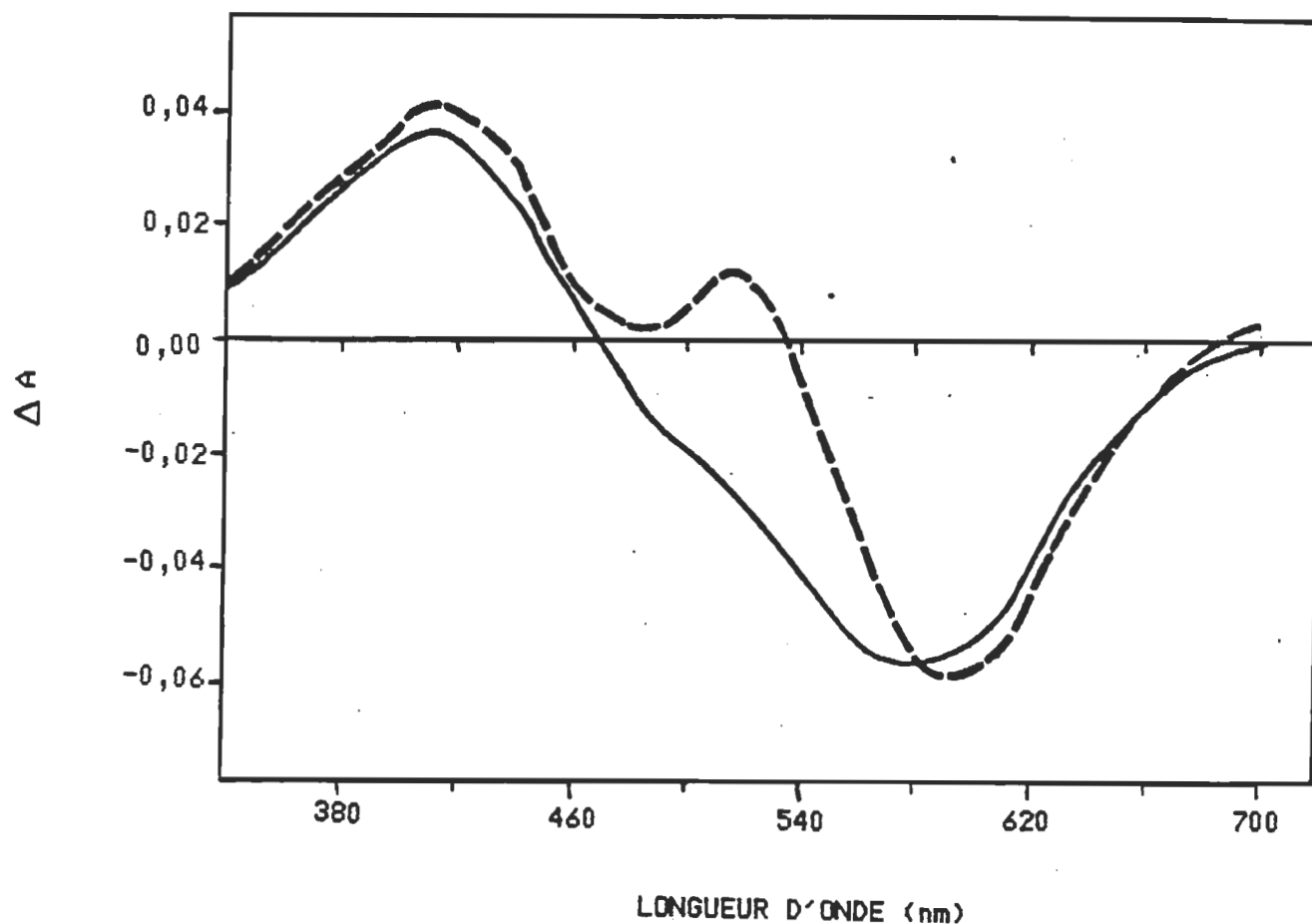


Figure 29: Formation du batho-intermédiaire de la bR480. Spectre de différence résultant de la soustraction du spectre de différence obtenu à une  $\lambda$  d'irradiation de 550nm (normalisé entre 600 et 700nm) de celui obtenu à une  $\lambda$  d'irradiation de 450nm (voir figure 28).

situé à 610nm.

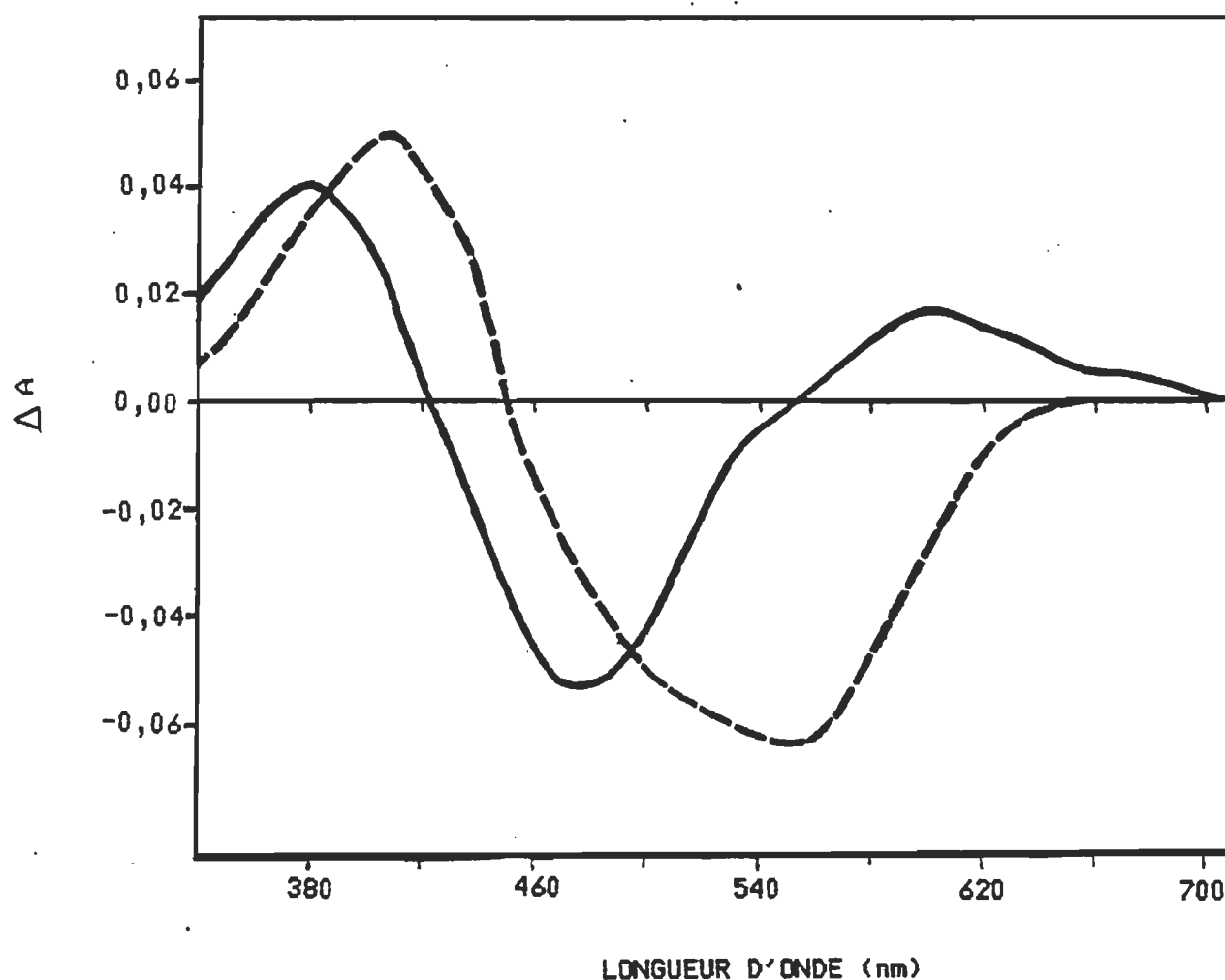
L'analyse spectrale du méta-intermédiaire peut s'effectuer de deux manières différentes. En premier lieu, nous pouvons réchauffer les différents batho-intermédiaires à une température de 220°K. La figure (30) représente les spectres de différence obtenus après soustraction des spectres d'absorption obtenus à 80°K après irradiation des échantillons soit à 450, soit à 550nm, des spectres d'absorption mesurés après réchauffement des échantillons à 220°K. La batho-bR formée par irradiation à 550nm disparaît (minimum vers 600nm) pour former une méta-bR autour de 410nm, tandis que lorsque le batho-intermédiaire est formé à une  $\lambda$  d'irradiation de 450nm, le spectre de différence nous montre une bande large dans la région entre 500 et 600nm qui disparaît pour former encore un méta-produit vers 410nm.

Le méta-intermédiaire peut cependant être étudié d'une autre manière, plus directe, c'est-à-dire par irradiation (soit à 450 ou à 550nm) des échantillons de bR délipidée, à une température de 220°K (température à laquelle le méta-intermédiaire est stable). De cette façon (figure 31), nous observons un minimum autour de 540nm et un maximum vers 410nm lorsque la bR délipidée est irradiée à une  $\lambda=550$ nm. Cependant, lorsque l'irradiation s'effectue à 450nm, le minimum est situé à 480nm et le méta-intermédiaire qui apparaît a une bande d'absorption qui est alors positionnée à 380nm.



**Figure 30:** Formation des méta-intermédiaires de la BR délipidée à partir des batho-intermédiaires. Spectres de différences enregistrés lorsque les échantillons sont réchauffés à une température de 220°K.

- (—) Méta-intermédiaire formé à partir du batho-intermédiaire obtenu par irradiation à 450nm.
- (---) Méta-intermédiaire formé à partir du batho-intermédiaire obtenu par irradiation à 550nm.



**Figure 31:** Formation des méta-intermédiaires de la bR délipidée. Spectres de différences enregistrés après irradiation des échantillons à 220°K. Ceux-ci sont contenus dans 60% de glycérol dans un tampon phosphate 50mM (pH=7).

(—) Spectre enregistré après 10 minutes d'irradiation au travers d'un filtre interférentiel à 450nm.

(---) Spectre enregistré après 10 minutes d'irradiation au travers d'un filtre interférentiel à 550nm.

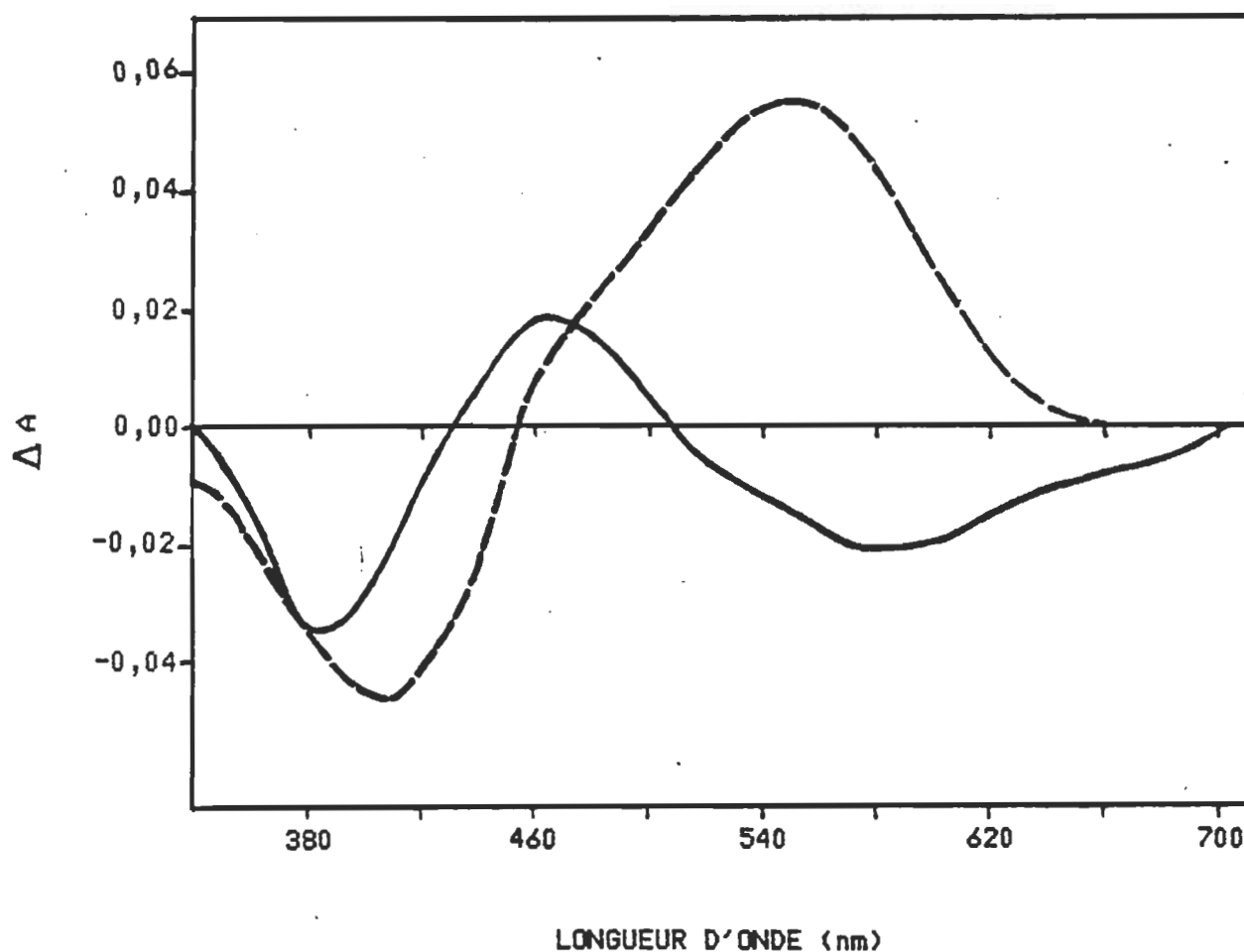
Si, par la suite, les échantillons sont réchauffés jusqu'à la température initiale, soit 298°K (figure 32), les deux formes spectrales correspondant aux méta-intermédiaires spécifiques M-bR380 et M-bR410 se convertissent en leur pigment initial respectif soit bR480 et bR540.

### 3.7.2.2 Discussion

Lorsqu'on excite la bR délipidée à 450 et 550nm, nous observons la formation de deux batho-intermédiaires différents possédant des  $\lambda_{\text{max}}$  à 530 et 610nm respectivement. La figure (29) nous montre clairement que la batho-bR530 provient du pigment absorbant à 480nm et non de la bR540 que l'on retrouve aussi dans l'échantillon. On retrouve également deux batho-intermédiaires différents lorsque la bR délipidée est en solution dans le lauryl sucrose (voir introduction, section 1.6). Le maximum d'absorption à 610nm est comparable à celui obtenu pour la batho-bR à partir de la MP native. Les déplacements spectraux induits lors de la formation de chacun de ces batho-produits sont tous du même ordre de grandeur soient 1938 (bR native), 1983 (bR540) et 2141cm<sup>-1</sup> (bR480) indiquant que des changements semblables se produisent dans ces trois espèces au niveau de l'isomérisation du rétinale et du réarrangement des interactions rétinale-protéine (Lewis, 1982).

Lorsqu'on irradie les échantillons de bR délipidée à 220°K, on aperçoit aussi la présence de deux





**Figure 32:** Conversion des méta-intermédiaires en leur pigment initial respectif. Spectres de différence enregistrés à la température de la pièce.

(—) Spectre enregistré suite au réchauffement de l'échantillon de 220° (qui a été irradié à 450nm: figure 31) à 298°K.

(---) Spectre enregistré suite au réchauffement de l'échantillon de 220° (qui a été irradié à 550nm: figure 31) à 298°K.

métabolites intermédiaires différents absorbant à 380nm (bR480) et à 410nm (bR540). Ainsi le métabolite produit de la bR480 subit un déplacement hypsochrome de son spectre d'absorption comparativement au métabolite intermédiaire de la MP native. Dans le spectre de différence, le métabolite produit montre un maximum d'absorption à 380nm au lieu de 410nm dans la MP native. De plus, le même spectre de différence montre un minimum à 480nm, indiquant que la métabolite bR origine du pigment absorbant à 480nm plutôt que du pigment ayant un  $\lambda_{\text{max}}$  à 540nm qui est présent en petite quantité dans l'échantillon.

Ce déplacement vers le bleu du spectre d'absorption du métabolite intermédiaire se produit aussi lorsqu'on irradie des échantillons de bR délipidée en solution dans le lauryl sucrose et lorsque la MP est soumise à l'action d'anesthésiques volatils comme l'enflurane (métabolite bR=380nm). Dans ces conditions expérimentales, la bR570 est en équilibre avec une autre forme spectrale ( $\lambda_{\text{max}}$ =480nm) qui s'apparente de près avec la bR480 formée par la délipidation de la bR, et cet équilibre est réversible par l'évaporation de l'enflurane (Henry et coll. 1987).

Ainsi, malgré le fait que la bR délipidée ait pu subir des changements conformationnels, ceux-ci ne semblent pas empêcher le chromophore de posséder un cycle photoréactionnel. Donc, les changements structuraux se produisant lors de la délipidation de la bR semblent à la fois impliquer des groupements de la

protéine jouant un rôle dans le contrôle du maximum d'absorption des chromophores de bR sans toutefois enlever au pigment délipidé ses propriétés photochimiques. Ceci nous indique que le groupement responsable du déplacement spectral (560nm→480nm) n'a pas de relation (du moins) directe avec les événements se produisant lors de la photoréaction de la bR.

### 3.8 Adaptation à la lumière de bR480

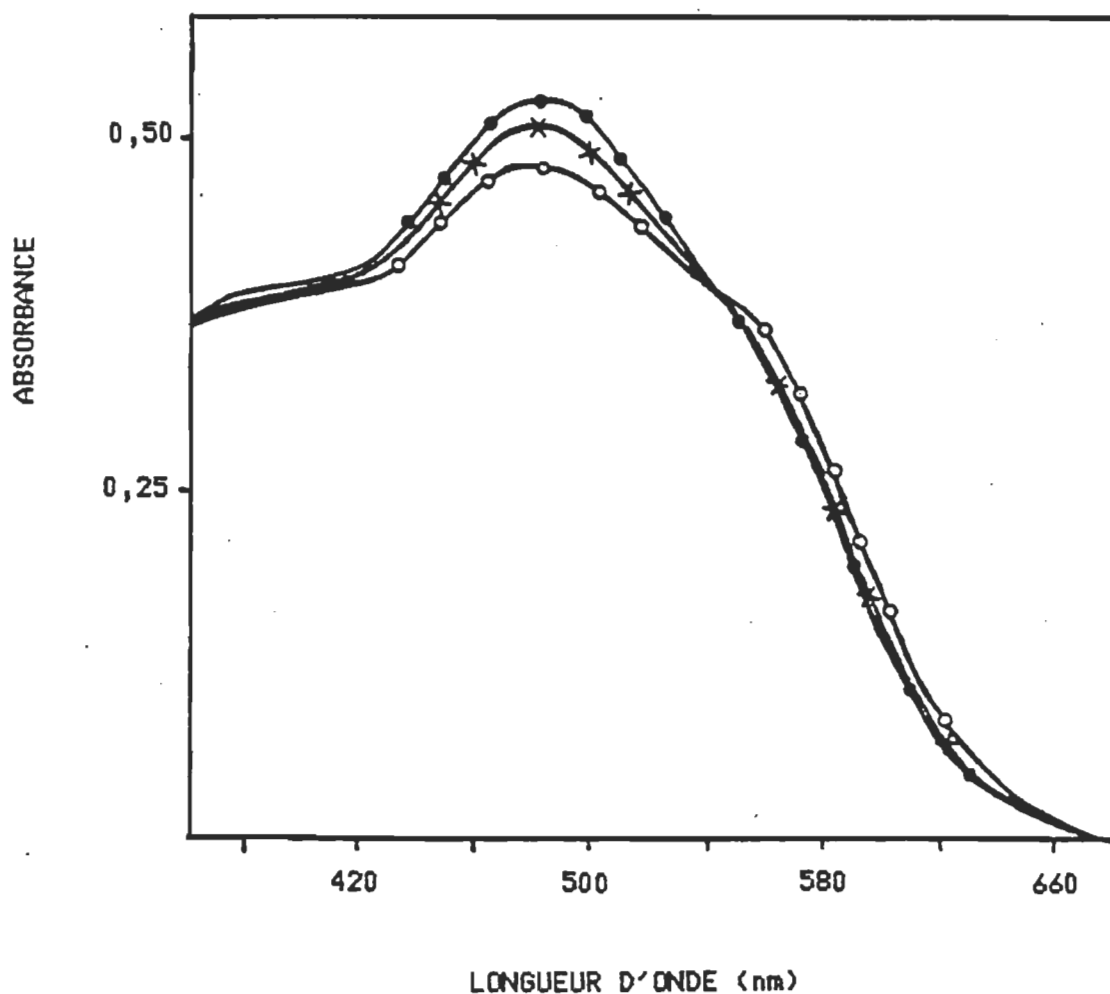
#### 3.8.1 Principe

Une des façons de vérifier l'intégrité fonctionnelle et structurale de la bR consiste à mesurer sa capacité d'adaptation à la lumière. La bR native existe sous deux formes stables et interconvertibles: une forme adaptée à l'obscurité constituée d'un mélange équimolaire de tout-trans et de 13-cis rétinol ayant un maximum d'absorption centré autour de 560nm. Ce mélange se convertit suite à une courte exposition à une source lumineuse intense en une bR adaptée à la lumière, ne contenant que du tout-trans rétinol et absorbant à 570nm (Oesterhelt et coll. 1973). Cette réaction implique une isomérisation du 13-cis en tout-trans rétinol. Nous savons que des modifications de l'état d'agrégation (trimères-monomères) de la bR dans la MP native ainsi que des interactions rétinol-protéine ne privent pas la bR de sa capacité d'adaptation à la lumière, quoiqu'elle semble être légèrement diminuée. Il serait donc intéressant de savoir si les interactions lipides-protéines sont essentielles à cette adaptation. Dans ce but, la capacité d'adaptation à la lumière a été étudiée pour la bR purifiée sans détergent afin de déterminer si cette forme de bR délipidée conserve les propriétés de la MP native.

#### 3.8.2 Résultats

Lorsque la bR délipidée exempte de détergents est éclairée par la lumière d'un projecteur muni d'un filtre interférentiel ayant une

bande passante étroite à 450nm, le spectre d'absorption de la bR semble se modifier dans la région des plus longues longueurs d'onde (figure 33). La figure (34) nous montre le spectre de différence obtenu après soustraction du spectre de bR480 avant illumination de celui obtenu après illumination. Ce spectre de différence nous indique que la bR480 disparaît pour former une autre espèce absorbant à environ 575nm. On retrouve aussi dans la figure (34) les spectres de différences de l'adaptation à la lumière de la bR/MP native et aussi de la bR délipidée excitée à 550nm. Ces spectres présentent tous la même situation: la disparition de l'espèce excitée et l'apparition d'une nouvelle forme spectrale entre 575 et 600nm. Ainsi, il semble que la bR délipidée possède certaines des caractéristiques qu'on observe lors de l'adaptation à la lumière de la MP native malgré le fait qu'elle ait pu subir des changements conformationnels au cours de la délipidation. Cependant, au cours de l'illumination, l'absorbance à 480nm diminue au lieu d'augmenter comme dans la MP native (figure 35). Et lors de l'adaptation à l'obscurité, le maximum d'absorption à 480nm revient à sa position originale sur la même période de temps que dans le cas de la bR dans la MP native qui voit son maximum d'absorption réitérer sa position initiale à 560nm. Il serait intéressant de noter que le phénomène d'adaptation à la lumière n'est pas parfaitement élucidé, et qu'on ne peut tirer que des conclusions très arbitraires sur ce qui se passe lors de l'adaptation à la lumière dans les chromophores de bR. Toutefois, il semble improbable qu'il ne s'agisse que d'une isomérisation ayant lieu du 13-cis au tout-trans rétinale. Ceci est



**Figure 33:** Adaptation à la lumière de la bactériorhodopsine délipidée en absence de détergent.

- (●-●-●) Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine délipidée dans sa forme adaptée à l'obscurité.
- (○-○-○) Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine délipidée dans sa forme adaptée à la lumière.
- (x-x-x) Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine délipidée gardée à l'obscurité pendant 45 minutes après l'adaptation à la lumière.

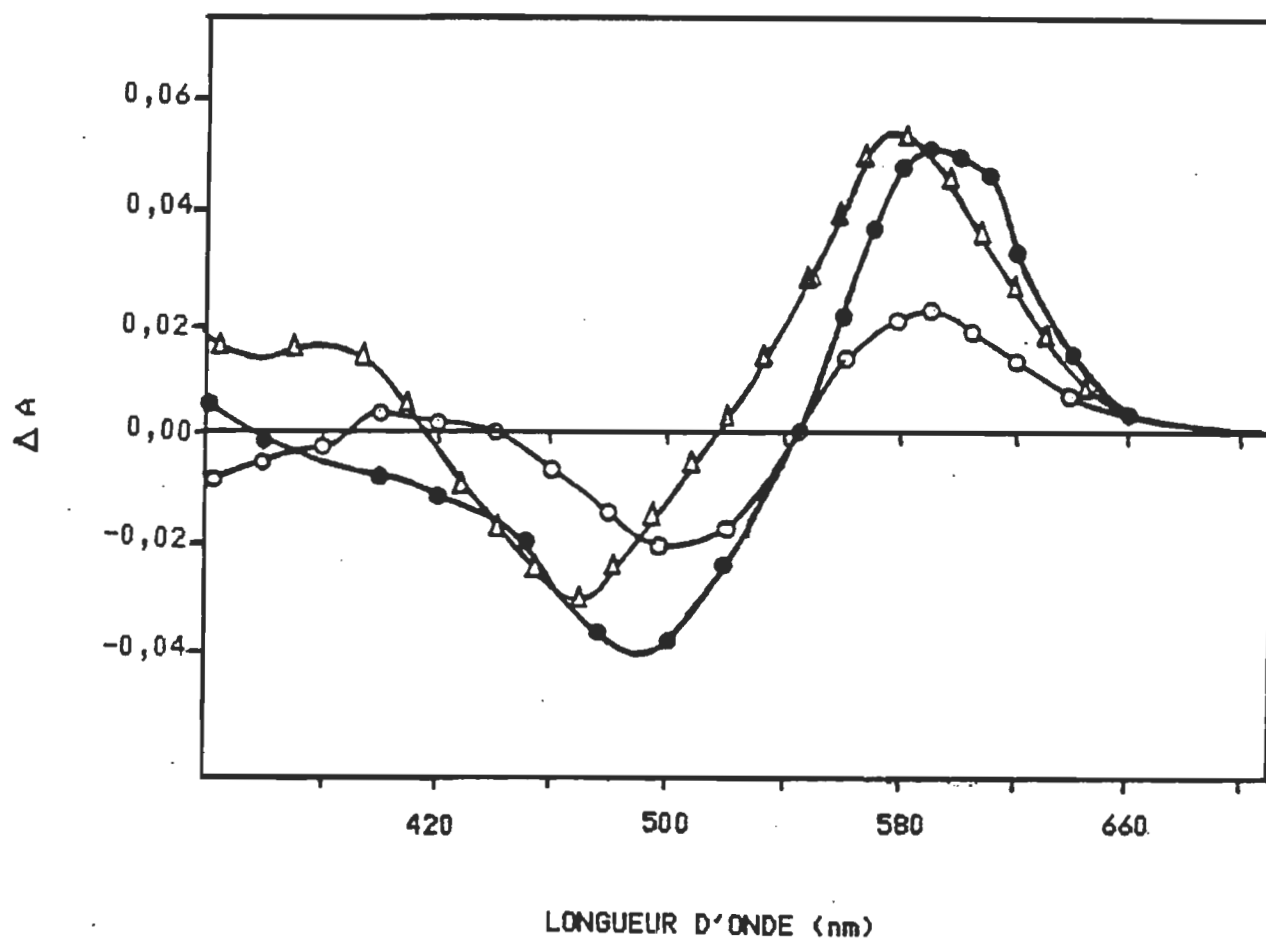


Figure 34: Spectres de différences enregistrés lors de l'adaptation à la lumière:

(Δ-Δ-Δ) De la bR délipidée irradiée à 450nm.

(○-○-○) De la bR délipidée irradiée avec une lumière blanche.

(●-●-●) De la bR native contenue dans la membrane pourpre, irradiée avec une lumière blanche.

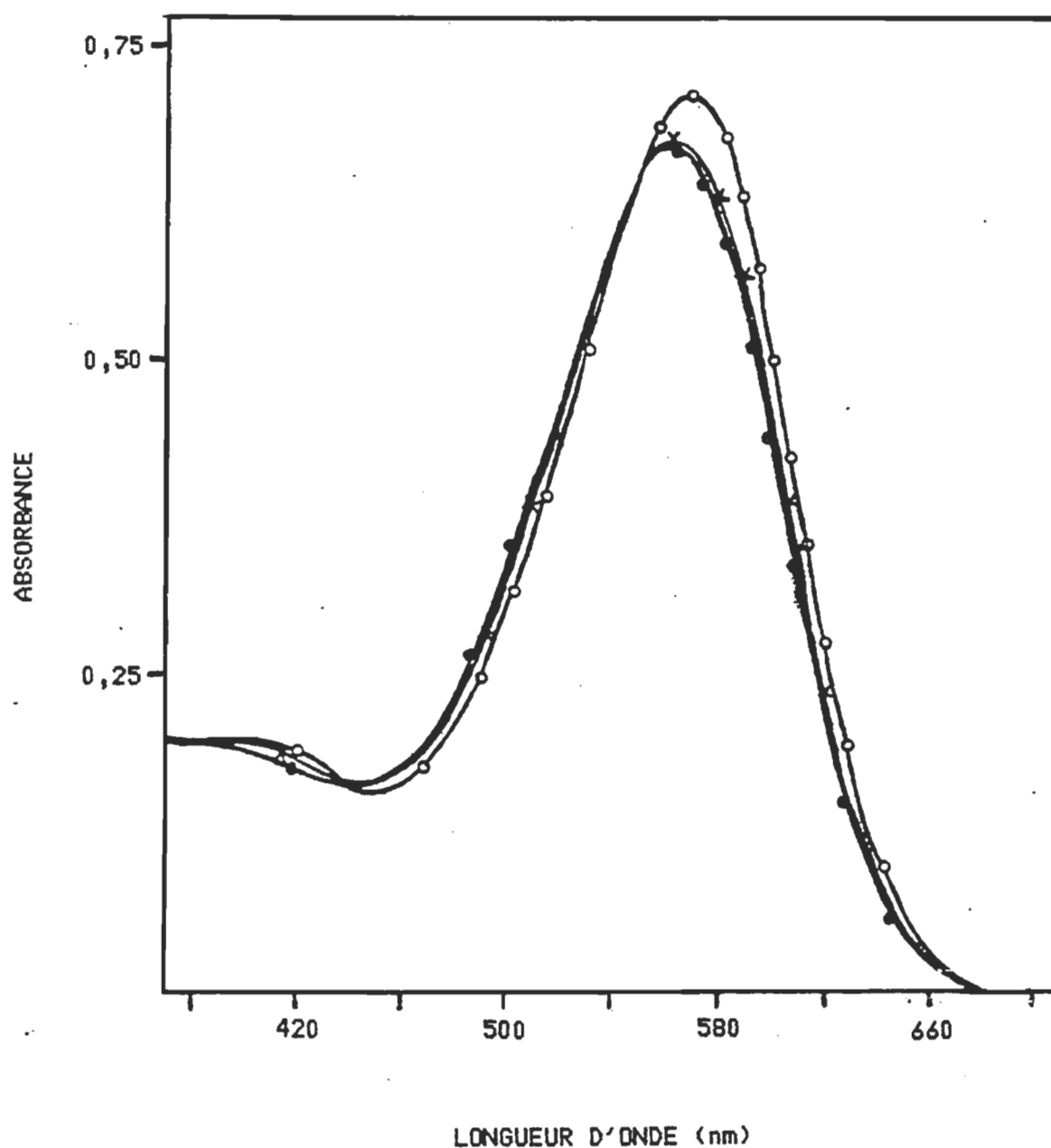


Figure 35: Adaptation à la lumière de la bactériorhodopsine contenue dans sa membrane pourpre native.

(●-●-●) Spectre d'absorption de la bR dans sa forme adaptée à l'obscurité.

(○-○-○) Spectre d'absorption de la bR dans sa forme adaptée à la lumière.

(X-X-X) Spectre d'absorption de la bR gardée à l'obscurité pendant 45 minutes après l'adaptation à la lumière.



suggéré par le fait que les anesthésiques volatils (Henry et coll. 1987)) et le DMSO (Pande et coll. 1986) agissent en particulier sur une seule des deux formes isomériques, c'est-à-dire le tout-trans rétinale, et n'aient pas d'effet sur la forme 13-cis du pigment.

Nous avons montré jusqu'à maintenant que la bR480 possède plusieurs caractéristiques d'un chromophore modèle en solution, lequel n'est pas influencé par un environnement protéique. L'irradiation du rétinale en solution mène à la formation de plusieurs isomères du rétinale: tout-trans, 13-cis, 9-cis, 11-cis et 9,13-dicis rétinale (Sperling et coll. 1977), contrairement au pigment de la membrane pourpre dont la protéine se lie sélectivement avec des isomères particuliers du rétinale. Dans la bR native, le rétinale est isomérisé seulement en des formes isomériques spécifiques à la lumière (forme tout-trans) et à l'obscurité (forme 13-cis). Nous avons amorcé des études de composition isomérique de la bR480 et nous avons observé plusieurs taches, par chromatographie sur couche mince, qui ne sont pas observées dans les échantillons de bR native. Nous n'avons pas identifié à quelle forme isomérique ces taches sont reliées, cependant on pourrait s'attendre à ce que l'irradiation de la bR480 puisse aussi donner naissance à la formation de plusieurs formes isomériques du rétinale, comme pour les chromophores en solution, puisque la bR480 semble être un pigment résultant de la perte d'interactions avec la bactériorhodopsine lorsque les lipides sont absents.

## CHAPITRE IV

DISCUSSION GENERALE

La délipidation de la bR a été effectuée selon une méthode standard en utilisant le Triton X-100 comme détergent. Il est à remarquer que seul ce détergent réussit à délipider complètement la bR, ce qui nous porte à croire que les interactions qui existent entre les lipides et la protéine de la membrane pourpre ne sont pas facilement détruites avec la plupart des détergents. Après l'échange de détergents par chromatographie hydrophobe, des monomères de bR dans le lauryl sucrose ont été obtenus. Ces échantillons de bactériorhodopsine ne contiennent pas de quantité détectable de lipides membranaires et possèdent une caractéristique tout à fait particulière, c'est-à-dire une dépendance du spectre d'absorption en fonction du pH de l'échantillon. En effet, contrairement à la MP native et solubilisée qui montrent une bande d'absorption toujours située à la même longueur d'onde indépendamment du pH entre 5 et 10, la bR délipidée dans le lauryl sucrose montre un équilibre entre deux formes spectrales distinctes:  $bR480 \xrightleftharpoons[OH^-]{H^+} bR540$ .

Afin d'établir la dépendance environnementale de l'équilibre acido-basique retrouvé dans le lauryl sucrose, nous avons élué la bR avec un autre détergent, l'octyl glucoside, lors de la chromatographie par interaction hydrophobe. Ce détergent possède la propriété de se dialyser facilement et il nous a permis d'obtenir des échantillons de bR purifiée dépourvue de lipides et de détergents. Dispersée dans l'octyl glucoside, la bR est moins stable que dans les esters de sucrose ou dans le Triton X-100, cependant la procédure que nous avons établie est suffisamment

rapide pour éviter une dénaturation significative du pigment. Suite à la dialyse de l'octyl glucoside, le maximum d'absorption du pigment se situe à 480nm, accompagné d'un léger épaulement à 540nm. A notre connaissance, c'est la première fois qu'on réussit à préparer des échantillons de bR purifiée sans détergents et sans lipides, qu'on peut facilement concentrer par sédimentation et conserver sur une période de temps considérable. En plus de nous permettre de concentrer la bR purifiée, cette méthode donne l'avantage de rendre possible, par la suite, la réassociation de la bR dépourvue de lipides et de détergents avec les molécules amphiphiles désirées, facilement et rapidement, ce qui nous a permis d'étudier l'effet de l'environnement hydrophobe sur l'équilibre entre les deux formes spectrales de la bactériorhodopsine (480 et 540nm).

Le pigment purifié a ainsi été dispersé dans quelques détergents dans lesquels il est stable, comme le Triton X-100 et une série d'esters de sucrose comportant différentes longueurs de chaînes hydrophobes. Lorsque la bR est agrégée dans l'eau (bR480), la valeur du pKa du groupement qui contrôle l'équilibre acido-basique des deux formes spectrales est de 2,5 et ceci pourrait être la valeur du pKa du groupement titrable lorsqu'il est directement accessible à partir de la phase aqueuse. Les courbes de titration obtenues lorsque la bR est dispersée dans les différents détergents sont déplacées vers des valeurs de pH plus élevées. L'association du pigment purifié avec les détergents favorise la régénération du pigment original absorbant à 540nm et sa stabilité lors de l'alcalinisation augmente lorsque la chaîne hydrophobe du détergent devient plus longue, le pigment pourpre délipidé le plus

stable étant obtenu dans le Triton X-100. Lorsque le pigment est associé avec des détergents ayant des chaînes hydrophobes de plus en plus longues, le groupement titrable semble devenir de moins en moins accessible à la titration et de ce fait, son pKa apparent augmente considérablement. Dans la MP native ou solubilisée, le site de titration semble très isolé de la phase aqueuse et l'équilibre acido-basique n'est pas facilement observé. Cependant, il est manifeste que non seulement la structure membranaire mais aussi les interactions lipides-protéines contribuent à la stabilisation du chromophore natif. En effet, dans les membranes pourpres solubilisées, la bactériorhodopsine monomérique n'est pas séparée des lipides membranaires, et dans ces conditions, le pigment absorbant à 480nm apparaît seulement à des valeurs de pH plus élevées que 11,5. Nous proposons donc que l'interaction que la bactériorhodopsine entretient avec ses lipides membranaires est responsable du maintien de la couleur pourpre du pigment. D'autre part, les valeurs de pKa obtenues dans les différents détergents reflèterait la force des interactions de la BR avec ces molécules amphiphiles.

Afin de préciser la nature du chromophore de BR480, nous l'avons comparé à la bactériorhodopsine native en utilisant la spectroscopie de résonnance Raman. Ces expériences nous ont rapidement permis de conclure que le site de titration responsable de l'équilibre entre les deux formes spectrales de la bactériorhodopsine N'EST PAS l'azote du lien aldimine qui relie le rétinol à la bactériopsine puisque, dans les deux formes, la base de Schiff est protonée.

Parcontre, les spectres vibrationnels obtenus par RR et d'autres mesures citées ci-après nous permettent d'affirmer que la formation de bR480 correspond à des changements de l'interaction chromophore-protéine liés à des changements structuraux de la protéine lors de sa délipidation. L'argumentation qui soutient cette affirmation est:

1) Selon les expériences en Raman de résonance:

- a) La fréquence du mode d'élongation C=C dans la bR480 est environ du même ordre de grandeur que celle des chromophores modèles en solution, lesquels n'ont pas d'interactions électrostatiques (provenant de l'opsine) au niveau de l'anneau ionone du rétinale, ce qui suggère une diminution des interactions rétinale-protéine. De même, la région du "fingerprint" du spectre de bR480 s'apparente de très près à celle des chromophores modèles en solution.
- b) Les variations dans les valeurs des déplacements induits par la deutériation de la bR purifiée par rapport à d'autres protéines (rhodopsine, bR/MP, BS en solution) sont principalement reliées à l'environnement créé par la protéine autour du site de liaison du chromophore. Ceci nous suggère encore que suite à la purification, il se produit une diminution des interactions rétinale-protéine et aussi que le contre-ion de l'azote s'éloigne de l'atome d'azote et que conséquemment la base de Schiff dans la bR480 est plus protonée que dans la bR native.
- c) Lorsque la bR délipidée est dispersée dans le lauryl sucrose, nous apercevons un changement dans le maximum d'absorption de 480 à

540nm (dépendant du pH) ainsi que des différences caractéristiques dans les spectres RR par rapport à la bR480. Le spectre RR ressemble alors beaucoup plus à celui de la bR native. Il semble donc que le détergent mime quelques propriétés des lipides et redonne à la bR les interactions rétinal-protéine qui la gouvernent dans la MP.

- 2) Les spectres d'absorption et le photocycle des pigments artificiels sont comparables à ceux de bR480 lorsque sont introduits des groupements provoquant de l'encombrement stérique dans la région de l'anneau ionone du rétinal; ceci supporte les autres arguments en ce qui concerne l'augmentation de la séparation entre la protéine et le rétinal dans la bR480. En admettant que la ou les charges de l'anneau se soient éloignées, le déplacement bathochrome de 40nm dans la bR480 par rapport aux chromophores modèles en solution (440nm) devient explicable par la séparation plus grande du contre-ion de l'azote.
- 3) Le spectre d'émission de fluorescence intrinsèque de la bR480 présente des différences significatives dans la position de la bande d'émission des tryptophanes par rapport à la bR native. La position de la bande d'émission du Try est sensible au microenvironnement et subit des déplacements bathochromes lorsque ce résidu passe d'un environnement hydrophobe à un environnement plus aqueux. C'est précisément cet effet que l'on observe dans bR480 et il suggère que les changements de fluorescence observés par comparaison à la MP native proviennent d'un changement conformationnel de la protéine lors de la délipidation, conduisant à l'exposition des résidus Try à un environnement plus

aqueux par comparaison à un environnement plus hydrophobe dans la MP native.

- 4) Lorsque la bR480 est soumise à l'action de l'hydroxylamine et du borohydrure de sodium à l'obscurité, la bande d'absorption correspondant au chromophore disparaît pour former une nouvelle espèce avec un  $\lambda_{\text{max}}$  entre 330 et 360nm. Ces produits réagissent normalement avec la BS dans la MP seulement lorsqu'on illumine les échantillons de bR, au cours des changements qui ont lieu lors du photocycle de la bR native. Or, le chromophore de la bR purifiée réagit à l'obscurité avec ces produits; ce qui nous indique que la protéine possède alors une conformation beaucoup plus ouverte pour qu'elle rende accessible le site de la réaction, la BS, qui n'est normalement pas accessible à l'obscurité dans la MP native. De plus, la structure fine de la bande d'absorption retrouvée lors de la réduction de la BS par le borohydrure dans la MP n'est pas observée lorsque la bR purifiée réagit avec ce produit. Cette perte de structure fine est, elle aussi, attribuable à des modifications des interactions rétinal-protéine.

Tous ces résultats vont dans le sens d'un déploiement de la structure de la bR accompagné d'une diminution sensible des interactions que la protéine entretient avec le chromophore. De plus, cette interprétation est en accord avec les résultats obtenus par des mesures semblables effectuées par le groupe de Robert Callender (New York) où une forme spectrale absorbant aussi à 480nm provenant de l'introduction de diméthyl sulfoxyde dans les MP natives a été analysée.

Malgré ces modifications de la structure de la bactérioropsine, la bR purifiée possède tout de même une activité photochimique, qui est quelque peu ralentie comparativement à la bR dans la MP native. Par irradiation sélective de bR480 et bR540, nous observons la formation de deux batho-intermédiaires différents à 530 et 610nm respectivement. Le maximum d'absorption à 610nm est comparable à celui de la batho-bR des MP natives. Les déplacements spectraux induits lors de la formation de chacun de ces batho-produits sont tous du même ordre de grandeur, ce qui indique que des changements semblables se produisent dans ces espèces au niveau de l'isomérisation du rétinol et de son réarrangement à l'intérieur de la protéine. On a aussi la présence de deux méta-intermédiaires différents à 380nm pour la bR480 et à 410nm pour la bR540, par rapport à une méta-bR à 410nm pour la bR native. Ainsi le méta-produit de la bR480 subit un déplacement hypsochrome de son spectre d'absorption comparativement à celui de la MP native. Ce déplacement vers le bleu du spectre d'absorption du méta-intermédiaire se produit aussi lorsque les interactions lipides-protéines dans la membrane pourpre sont perturbées par des anesthésiques (Henry et coll. 1987).

Ainsi, les changements structuraux se produisant lors de la délipidation de la bR semblent à la fois impliquer des groupements de la protéine jouant un rôle dans le contrôle du maximum d'absorption des chromophores de bR sans toutefois enlever au pigment délipidé ses propriétés photochimiques, ce qui indique que le groupement responsable du déplacement spectral n'a pas de relation directe avec les événements se produisant lors de la photoréaction de la bR.



De même, la bR délipidée semble posséder certaines des caractéristiques qu'on observe lors de l'adaptation à la lumière de la MP native. Cependant, lors de l'illumination, le  $\lambda_{\text{max}}$  à 480nm diminue alors qu'on observe une augmentation du maximum d'absorption de la bR dans la MP native. Ce phénomène d'adaptation n'est pas parfaitement compris et il pourrait se produire plus qu'une isomérisation du 13-cis en tout-trans rétinol lors de ce phénomène. Ainsi on pourrait imaginer que l'adaptation implique des réarrangements au niveau des interactions lipides-protéines. Un indice de ceci est que les anesthésiques volatils, des molécules liposolubles, ne réussissent à réagir qu'avec la forme tout-trans de la bactériorhodopsine. Toutefois on ne peut pas non plus éliminer la possibilité que l'irradiation de la bR480 conduise à la formation de plusieurs formes isomériques du rétinol, comme c'est le cas pour les chromophores en solution. Dans la bR native cette possibilité serait éliminée par des interactions plus fortes avec la cavité protéique.

On peut donc conclure que, dans la bactériorhodopsine délipidée, la base de Schiff est protonée tout comme dans la bR native. Ceci nous suggère alors qu'un résidu quelconque de la protéine, possédant un pKa qui est sensible à la présence des lipides, est responsable de la transition observée. Les changements de pKa sont identifiables à des changements structuraux de la protéine résultant de la perte d'interactions lipides-protéines lors de la délipidation. Ces changements conformationnels exposent, en plus de la base de Schiff, un groupement de la protéine qui est normalement enfoui dans la structure protéique et protégé du milieu extérieur, lequel contrôle directement le maximum

d'absorption de la bactériorhodopsine. Les interactions lipides-protéines modulent donc les interactions spécifiques entre le rétinal et la protéine et l'intégrité structurale et fonctionnelle est maintenue et protégée par des interactions lipidiques.

Enfin, ces résultats montrent bien, dans leur ensemble, l'amplitude de l'effet modulateur que les lipides peuvent avoir sur une protéine membranaire.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abram D. et Gibbons N.E. Turbidity of suspensions and morphology of red halophilic bacteria as influenced by sodium chloride concentration. Can. J. Microbiol., 1960, 6, 535.
- Andley U.P. et Chakrabarti B. Environments of tyrosine and tryptophan in rhodopsin as compared to bacteriorhodopsin. Photochem. Photobiophys., 1982, 4, 63-71.
- Aton B., Doukas A.G., Callender R.H., Becher B. et Ebrey T.G. Resonance Raman studies of the purple membrane. Biochemistry, 1977, 16, 2995-2999.
- Aton B., Doukas A.G., Narva D., Callender R.H., Dinur U. et Honig B. Resonance Raman studies of the primary photochemical event in visual pigments. Biophys. J., 1980, 29, 79-94.
- Baribeau J. Aspect biochimique et photochimique de la conversion d'énergie par la bactériorhodopsine. Mémoire de maîtrise, U.Q.T.R., 1984.
- Baribeau J. et Boucher F. Isolation, purification, and partial characterization of stable forms of monomeric bacteriorhodopsin in lauryl sucrose. Can. J. Biochem. Cell Biol., 1985, 63, 305-312.
- Bayley H., Hojberg B., Huang K.S., Khorana G.H., Liao M.-J., Lind C. et London E. Delipidation, renaturation et reconstitution of bacteriorhodopsin. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology (vol. 88). Toronto: Academic Press, 1982, 74-81.

- Bayley S.T. et Morton R.A. Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. CRC Critical reviews in Microbiol., 1978, 151-205.
- Becher B. et Ebrey T.G. Evidence for chromophore-chromophore (exciton) interaction in the purple membrane of Halobacterium halobium. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, 69, 1-6.
- Beece D., Bowne S.F., Czege J., Eisenstein L., Frauenfelder H., Good D., Marden M.C., Marque J., Ormos P., Reinisch L. et Yue K.T. The effect of viscosity on the photocycle of bacteriorhodopsin. Photochem. Photobiol., 1981, 33, 517-522.
- Blaurock A.E. et King G.I. Asymmetric structure of the purple membrane. Science, 1977, 196, 1101.
- Blaurock A.E. et Stoeckenius W. Structure of the purple membrane. Nature (London) New Biol., 1971, 233, 152-155.
- Braiman M. et Mathies R. Resonance Raman evidence for an all-trans to 13-cis isomerisation in the proton-pumping cycle of bacteriorhodopsin. Biochemistry, 1980, 19, 5421-5428.
- Bogomolni R.A., Stubbs L. et Lanyi J.K. Illumination-dependent changes in the intrinsic fluorescence of bacteriorhodopsin. Biochemistry, 1978, 17, 1037-1041.
- Brown A.D. et Shorey C.D. The cell envelopes of two extremely halophilic bacteria. J. Cell. Biol., 1963, 18, 681.

- Burstein E.A., Vedenkina N.S. et Ivkova M.N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. Photochem. Photobiol., 1973, 18, 263-279.
- Callender R.H. An introduction to visual pigments and purple membranes and their primary processes. In R.R. Alfano (Ed.), Biological Events Probed by Ultrafast Laser Spectroscopy. Toronto: Academic Press, 1982, pp. 239-258.
- Callender R.H. et Honig B. Resonance Raman studies in visual pigment. Annu. Rev. Biophys. Bioenq., 1977, 6, 33-55.
- Casadio R. et Dencher N.A.  $\Delta\mu\text{H}^+$  determination in phospholipid vesicles reconstituted with aggregated and monomeric bacteriorhodopsin. Biophys. Struct. Mech., 1981, 7, 291.
- Casadio R., Gutowitz H., Mowery P., Taylor M. et Stoeckenius W. Light-dark adaptation of bacteriorhodopsin in Triton-treated purple membrane. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 590, 13-23.
- Cho K.Y., Doy C.H. et Mercer E.H. Ultrastructure of the obligate bacterium Halobacterium Halobium. J. Bacteriol., 1967, 94, 196.
- Danon A. et Stoeckenius W. Photophosphorylation in Halobacterium halobium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1974, 71, 1234.
- Dencher N.A. et Heyn M.P. Formation and properties of bacteriorhodopsin monomers in the non-ionic detergents octyl- $\beta$ -D-glucoside and Triton X-100. FEBS Lett., 1978, 96, 322-326.

- Dencher N.A. et Heyn M.P. Bacteriorhodopsin monomers pump protons. FEBS Lett., 1979, 108, 307-310.
- Dencher N.A. et Heyn M.P. Preparation and properties of monomeric bacteriorhodopsin. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology (vol. 88). Toronto: Academic Press, 1982, 5-10.
- Dencher N.A., Kohl K.D. et Heyn M.P. Photochemical cycle and light-dark adaptation of monomeric and aggregated bacteriorhodopsin in various lipid environments. Biochemistry, 1983, 22, 1323-1334.
- Dencher N.A. et Wilms M. Flash photometric experiments on the photochemical cycle of bacteriorhodopsin. Biophys. Struct. Mech., 1975, 1, 259-271.
- DeGrip W.J. Thermal stability of rhodopsin and opsin in some novel detergents. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology (vol. 81). Toronto: Academic Press, 1982, 256-265.
- Doukas A.G., Aton B., Callender R.H. et Ebrey T.G. Resonance Raman studies of bovine metarhodopsin I et II. Biochemistry, 1978, 17, 2430-2435.
- Druckmann S., Ottolenghi M., Pande A., Pande J. et Callender R.H. Acid-base equilibrium of the Schiff base in bacteriorhodopsin. Biochemistry, 1982, 21, 4953-4959.
- Ebrey T.G., Becher B., Mao B. et Kilbride P. Exciton interactions and chromophore orientation in the purple membrane. J. Mol. Biol., 1977, 112, 377-397.

- Favrot J., Sandorfy C. et Vocelle D. An infrared study of the basicity of non-aromatic imines: relation to visual pigment. Photochem. Photobiol., 1978, 28, 271-272.
- Fischer U. et Oesterhelt D. Chromophore equilibria in bacteriorhodopsin. Biophys. J., 1979, 28, 211-230.
- Gibbons N.E. Family V. Halobacteriaceae Fam. nov. In R.E. Buchanan et N.E. Gibbons (Ed.), Bergey's Manual of determinative Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974, 269.
- Glaeser R.M., Jubb J.S. et Henderson R. Structural comparison of native and deoxycholate-treated purple membrane. Biophys. J., 1985, 48, 775-780.
- Helenius A. et Simons K. Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 415, 29-79.
- Henderson R. et Unwin P.N.T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. Nature (London) New Biol., 1975, 257, 28-32.
- Henry N., Beaudoin N., Baribeau J. et Boucher F. Further characterization of anesthetic-treated purple membrane. Photochem. Photobiol., 1987, in press.
- Heyde M.E., Gill D., Kilponen R.G. et Rimai L. Raman spectra of Schiff bases of retinal (models of visual photoreceptors). J. Am. Chem. Soc., 1971, 93, 6776-6780.

- Heyn M.P., Bauer J.P. et Dencher N.A. A natural circular dichroism label to probe the structure of the purple membrane from Halobacterium halobium by means of excitation coupling effects. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 67, 897-903.
- Honig B., Greenberg A., Dinur U. et Ebrey T.G. Visual-pigment spectra: implications of the protonation of the retinal Schiff base. Biochemistry, 1976, 15, 4593-4599.
- Huang K.S., Bayley H. et Khorana H.G. Delipidation of bacteriorhodopsin and reconstitution with exogenous phospholipid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1980, 77, 323-327.
- Hwang S.B. et Stoeckenius W. Purple membrane vesicles: morphology and proton translocation. J. Membrane Biol., 1977, 33, 325-350.
- Iwasa T., Tokunaga F. et Yoshizawa T. A new pathway in the photoreaction cycle of trans-bacteriorhodopsin and the absorption spectra of its intermediates. Biophys. Struct. Mech., 1980, 6, 253-270.
- Iwasa T., Tokunaga F. et Yoshizawa T. Photochemical reactions of bacteriorhodopsin in Triton X-100 solution studied by low temperature spectrophotometry. Can. J. Chem., 1985, 63, 1891-1898.
- Jost P.C., McMillen D.A. et Morgen W.D. Lipid-protein interactions in the purple membrane. In D.W. Deamer (Ed.), Light Transducing Membranes. New York: Academic Press, 1978, 141-155.



- Kakitani H., Kakitani T., Rodman H. et Honig B. Correlation of vibrational frequencies with absorption maxima in polyenes, rhodopsin, bacteriorhodopsin, and retinal analogues. J. Phys. Chem., 1983, 87, 3620-3628.
- Kates M. Ether-linked lipids in extremely halophilic bacteria. In F. Snyder (Ed.), Ether lipids Chemistry and Biology. New York: Academic Press, 1972, p. 351.
- Kates M. et Kushwaha S.C. The diphytanyl glycerol ether analogues of phospholipids and glycolipids in membranes of Halobacterium cutirubrum. In R. Paoletti, G. Porcellati et G. Jacini (Eds.), Lipids (vol. 1). New York: Raven Press, 1976, p. 267.
- Kates M., Kushwaha S.C. et Sprott G.D. Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology (vol. 88). Toronto: Academic Press, 1982, pp. 98-111.
- Khorana H.G., Gerber G.E., Herlihy W.C., Gray C.P., Anderegg R.J., Nihei K. et Biemann K. Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1979, 76, 5046-5050.
- Kushner D.J. Halophilic bacteria. Adv. Appl. Microbiol., 1968, 10, 73.
- Kushner D.J., Bayley S.T., Boring J., Kates M. et Gibbons N.E. Morphological and chemical properties of cell envelopes of the extreme halophile Halobacterium cutirubrum. Can. J. Biochem., 1964, 10, 483.

- Kushner D.J. et Onishi H. Absence of normal cell wall constituents from the outer layers of Halobacterium cutirubrum. Can. J. Biochem., 1968, 46, 997.
- Kushwaha S.C., Gochnauer M.B., Kushner D.J. et Kates M. Pigments and isoprenoid compounds in extremely and moderately halophilic bacteria. Can. J. Microbiol., 1974, 20, 241.
- Kushwaha S.C., Kates M. et Martin W.G. Characterization and composition of the purple and red membrane from Halobacterium cutirubrum. Can. J. Biochem., 1975a, 53, 284.
- Kushwaha S.C., Kramer J.K.G. et Kates M. Isolation et characterization of C50-carotenoid pigments and other polar isoprenoids from Halobacterium cutirubrum. Biochim. Biophys. Acta, 1975b, 398, 303.
- Lam E. et Packer L. Nonionic detergent effects on spectroscopic characteristics and the photocycle of bacteriorhodopsin in purple membranes. Arch. Biochim. Biophys., 1983, 221, 557-564.
- Larsen H. Halophilism. In I.C. Gunsalas et R.Y. Stanier (Eds.), The bacteria: a Treatise on Structure and Function. New York: Academic Press, 1962, p. 297.
- Larsen H. Biochemical aspects of extreme halophilism. Adv. Microb. Physiol., 1967, 1, 97.
- Lewis A. Resonance Raman spectroscopy of rhodopsin and bacteriorhodopsin: an overview. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology (vol. 88). Toronto: Academic Press, 1982, pp. 561-617.

- Lewis A., Spoohower J., Bogomolni R.A., Lozier R.H. et Stoeckenius W.  
Tunable laser resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1974, 71, 4462-4464.
- Litvin F.F., Balashov S.P. et Sineshchekov V.A. Primary photochemical transformations of bacteriorhodopsin in the purple membranes and cells of Halobacterium halobium by low-temperature spectrophotometry. Bioorgan. Chem., 1975, 1, 1967.
- Lozier R.H., Niederberger W., Bogomolni R.A., Hwang S.B. et Stoeckenius W. Kinetics and stoichiometry of light-induced proton release and uptake from purple membrane fragments, Halobacterium halobium cell envelopes, and phospholipid vesicles containing oriented purple membrane. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 440, 545-556.
- Lozier R.H., Niederberger W., Ottolenghi M., Sivorinovsky G. et Stoeckenius W. On the photocycles of light- and dark-adapted bacteriorhodopsin. In S.R. Caplan et M. Ginzburg (Eds), Energetics and structure of halophilic microorganisms. New York: Elsevier/North-Holland Biomed. Press, 1978, pp 123-141.
- Lugtenburg J., Muradin-Szweykowska M., Heeremans C., Pardoën J.A., Harbison G.S., Herzfeld J., Griffin R.G., Smith S.O. et Mathies R.A. Mechanism for the opsin shift of retinal's absorption in bacteriorhodopsin. J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, 3104-3105.

- Marcus M.A. et Lewis A. Resonance Raman spectroscopy of the retinylidene chromophore in bacteriorhodopsin (bR570), bR560, M412, and other intermediates: structural conclusions based on kinetics, analogues, models, and isotopically labeled membranes. Biochemistry, 1978, 17, 4722-4735.
- Massig G., Stockburger M., Gartner W., Oesterhelt D. et Towner P. Structural conclusion on the Schiff base group of retinylidene chromophores in bacteriorhodopsin from characteristic vibrational bands in the resonance Raman spectra of bR570 (all-trans), bR603 (3-dehydroretinal) and bR548 (13-cis). J. Raman Spectroscopy, 1982, 12, 287-294.
- Mathies R., Friedman T. et Stryer L. Resonance Raman studies of the conformation of retinal in rhodopsin and isorhodopsin. J. Mol. Biol., 1977, 109, 367-372.
- Naito T., Kito Y., Kobayashi M., Hiraki K. et Humanaka T. Retinal-protein interactions in bacteriorhodopsin monomers, dispersed in the detergent L-1690. Biochim. Biophys Acta, 1981, 637, 457-463.
- Nakanishi K., Balogh-Nair V., Arnaboldi M. et Tsujimoto K. An external point-charge model for bacteriorhodopsin to account for its purple color. J. Am. Chem. Soc., 1980, 102, 7945-7947.
- Nashima K., Mitsudo M. et Kito Y. Studies on cephalopod rhodopsin. Fatty acid esters of sucrose as effective detergents. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 536, 78-87.

- Nashima K., Kawase N. et Kito Y. Effect of phospholipid and detergent on the Schiff base of cephalopod rhodopsin and metarhodopsin. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 626, 390-396.
- Nishimura S., Mashimo T., Hiraki K., Hamanaka T., Kito Y. et Yoshiya I. Volatile anesthetics cause conformational changes of bacteriorhodopsin in purple membrane. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 818, 421-424.
- Oesterhelt D., et Hess B. Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of Halobacterium halobium. Eur. J. Biochem., 1973, 37, 316-326.
- Oesterhelt D., Meentzen M. et Schuhmann L. Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophores. Eur. J. Biochem., 1973, 40, 453-463.
- Oesterhelt D. et Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium. Nature (London) New Biol., 1971, 233, 149-152.
- Oesterhelt D. et Stoeckenius W. Functions of a new photoreceptor membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1973, 70, 2853-2857.
- Oseroff A.R. et Callender R.H. Resonance Raman spectroscopy of rhodopsin in retinal disk membranes. Biochemistry, 1974, 13, 4243-4248.

Ovchinnikov Y.A., Abdulaev N.G., Feigina M.Y., Kiselev A.V. et Lobanov N.A. The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview. FEBS Lett., 1979, 100, 219-224.

Pabst R., Nawroth T. et Dose K. Rapid detergent exchange in solutions of the membrane protein bacteriorhodopsin by preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). Fresenius Z Anal. Chem., 1984, 317, 672-673.

Padros E., Dunack M. et Sabes M. Induction of the blue form of bacteriorhodopsin by low concentrations of sodium dodecyl sulfate. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 769, 1-7.

Pande C., Pande A. et Callender R.H. Specific chromophore-protein interactions are required for the structure and the color of bacteriorhodopsin - A solvent perturbation study. Biophys. J., 1986, 49, 477a.

Pande J., Callender R.H. et Ebrey T.G. Resonance Raman study of the primary photochemistry of bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78, 7379-7382.

Peters R. et Peters J. Light- dark adaptation of bacteriorhodopsin in brown membrane. In S.R. Caplan & M. Ginzburg (Eds.), Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms. New York: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1978, 315-321.

- Peters J., Peters R. et Stoeckenius W. A photosensitive product of sodium borohydride reduction of bacteriorhodopsin. FEBS Letters, 1976, 61, 128-134.
- Pettei M.J., Yudd A.P., Nakanishi K., Henselman R. et Stoeckenius W. Identification of retinal isomers isolated from bacteriorhodopsin. Biochemistry, 1977, 16, 1955.
- Rabinovitch E. et Govindjee. Photosynthesis. New York: Wiley, 1969, 273 p.
- Racker E. et Stoeckenius W. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. J. Biol. Chem., 1974, 249, 662.
- Reynolds J.A. et Stoeckenius W. Molecular weight of bacteriorhodopsin solubilized in Triton X-100. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1977, 74, 2803-2804.
- Schreckenbach T. et Oesterhelt D. Photochemical and chemical studies on the chromophore of bacteriorhodopsin. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 1977, 36, 1810-1814.
- Schreckenbach T., Walckhoff B. et Oesterhelt D. Studies on the retinal-protein interaction in bacteriorhodopsin. Eur. J. Biochem., 1977, 76, 499-511.

- Sherman W.V. The ultraviolet fluorescence of bacteriorhodopsin and the location of tryptophanyl residues. Photochem. Photobiol., 1981, 33, 367-371.
- Sheves M., Baasov T. et Friedman N. On the binding site of bacteriorhodopsin. A study with artificial pigments. J. Am. Chem. Soc., 1984, 106, 2435-2437.
- Smith S.O., Myers A.B., Pardoen J.A., Winkel C., Mulder P.P.J., Lugtenburg J. et Mathies R. Determination of retinal Schiff base configuration in bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 2055-2059.
- Sperling W., Carl P., Rafferty Ch.N. et Dencher N.A. Photochemistry and dark equilibrium of retinal isomers and bacteriorhodopsin isomers. Biophys. Struct. Mechanism, 1977, 3, 79-94.
- Sportelli L. et Martino G. Photobiological conversion of solar energy. Part I. Bacteriorhodopsin proton pump activity in reconstituted liposomes. Bioelectrochem. and Bioenerg., 1982, 9, 197-206.
- Stockburger M., Klusmann W., Gattermann H., Massig G. et Peters R. Photochemical cycle of bacteriorhodopsin studied by resonance Raman spectroscopy. Biochemistry, 1979, 18, 4886-4900.



- Stoeckenius W. Bacteriorhodopsin. A light-energy transducing molecule from the cell membrane of Halobacteria (Chapter VII). Proceedings of the Robert A. Welch Conferences on Chemical Research XXIV. The synthesis, Structure and Function of Biochemical Molecules, 1980, pp. 133-147.
- Stoeckenius W. et Kunau W.H. Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of Halobacterium halobium and isolation of gas vacuole membranes. J. Cell. Biol., 1968, 38, 337.
- Stoeckenius W. et Lozier R.H. Light energy conversion in Halobacterium halobium. J. Supramol. Struct., 1974, 2, 769.
- Stoeckenius W. et Rowen R. A morphological study of Halobacterium halobium and its lysis in media of low salt concentration. J. Cell. Biol., 1967, 34, 365.
- Tanford C. et Reynolds J.A. Characterization of membrane proteins in detergent solutions. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 457, 133-170.
- Turner J., Hsieh C.L., Burns A.R. et El-Sayed M.A. Time-resolved resonance Raman spectroscopy of intermediates of bacteriorhodopsin: the bK590 intermediate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 3046-3050.
- Thomas D.D. et Stryer L. Transverse location of the retinal chromophore of bacteriorhodopsin in the purple membrane. Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 1980, 39, 1847.

Tokunaga F., Iwasw T. et Yoshizawa T. Photochemical reaction of bacteriorhodopsin. FEBS Lett., 1976, 72, 33-38.

Umadevi U., Sheves M., Rosenbach V. et Ottolenghi M. Photochemical studies of artificial bacteriorhodopsins. Photochem. Photobiol., 1983, 38, 197-203.

Unwin P.N.T. et Henderson R. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. J. Mol. Biol., 1975, 94, 425-440.

Wallace B.A. Comparaison of bacteriorhodopsin and rhodopsin molecular structure. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology (vol. 88). Toronto: Academic Press, 1982, pp. 447-462.